

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
4 septembre 2003 (04.09.2003)

(10) Numéro de publication internationale

PCT

WO 03/072787 A2

(51) Classification internationale des brevets⁷ :
C12N 15/62, C07K 14/715, G01N 33/50

(74) Mandataire : BOUVET, Philippe; AVENTIS PHARMA S.A., Direction Brevets, 20 Avenue Raymond Aron, F-92165 ANTONY CEDEX (FR).

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR03/00610

(81) États désignés (national) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(22) Date de dépôt international :
25 février 2003 (25.02.2003)

(84) États désignés (régional) : brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SI, SK, TR), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(25) Langue de dépôt : français

Publiée :

(26) Langue de publication : français

— sans rapport de recherche internationale, sera republiée dès réception de ce rapport

(30) Données relatives à la priorité :
02/02431 26 février 2002 (26.02.2002) FR

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.

(71) Déposants : AVENTIS PHARMA S.A. [FR/FR]; 20 Avenue Raymond Aron, F-92160 ANTONY (FR). INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE [FR/FR]; 101 rue de Tolbiac, F-75654 PARIS CEDEX 13 (FR). CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE [FR/FR]; 3 rue Michel Ange, F-75794 PARIS CEDEX 16 (FR).

(72) Inventeurs: JOCKERS, Ralph; 94 rue de Gometz, F-91440 BURES SUR YVETTE (FR). COUTURIER, Cyril; 17 rue Bénard, F-75014 PARIS (FR).



WO 03/072787 A2

(54) Title: METHOD FOR DETECTION OF LEPTIN RECEPTOR LIGANDS

(54) Titre : PROCEDE DE DETECTION DE LIGANDS DU RECEPTEUR DE LA LEPTINE

(57) Abstract: The invention relates to a method for detection of leptin receptor ligands as a function of the transfer of energy between fusion proteins comprising leptin receptors and energy-donor and -acceptor proteins. The invention further relates to fusion proteins for application in said method.

(57) Abrégé : La présente demande a pour objet un procédé de détection de ligands du récepteur de la leptine par mesure du transfert d'énergie entre des protéines de fusion composées de récepteurs de la leptine, et de protéines donneurs et accepteurs d'énergie. Elle est en outre relative à des protéines de fusion pour la mise en oeuvre de ce procédé.

PROCEDE DE DETECTION DE LIGANDS DU RECEPTEUR DE LA LEPTINE

La présente invention est relative à un procédé de détection de ligands du récepteur de la leptine par mise en œuvre du transfert d'énergie entre des protéines de fusion 5 composées de récepteurs de la leptine et de protéines donneurs ou accepteurs d'énergie.

Elle est en outre relative à des protéines de fusion pour la mise en œuvre de ce procédé.

10 La leptine est une protéine présentant un poids moléculaire de 16 kDa qui est sécrétée par les adipocytes. Cette protéine est associée à la sensation de satiété, et joue un rôle majeur dans le contrôle de la prise de poids, la consommation d'énergie, la formation osseuse, l'angiogénèse mais aussi dans d'autres fonctions physiologiques telles que le déclenchement de la puberté et le contrôle de la reproduction ou la régulation de la 15 réponse immunitaire régulée par les lymphocytes T.

Le récepteur de la leptine (OBR) appartient à la famille des récepteurs aux cytokines. Il est composé, comme l'illustre la figure 1 d'une chaîne polypeptidique unique comprenant un domaine transmembranaire (Tartaglia et al., J. Biol. Chem., 272, 6093- 6096, 1995). La demande de brevet WO 97/19952 est relative à ce récepteur.

20 Six isoformes différentes de l'OBR ayant des domaines C-terminaux de longueurs différentes ont été décrites. Ces isoformes dérivent toutes, par épissages alternatifs, d'un gène unique. Il existe également une forme soluble des OBR contenant le site de liaison à la leptine qui correspond au domaine extracellulaire des formes membranaires. Cette forme soluble générée de façon post-traductionnelle par 25 protéolyse à la membrane plasmique à partir des formes membranaires se retrouve dans le sang. Une autre forme soluble de l'OBR résultant d'une mutation générant un codon stop avant le domaine transmembranaire est également trouvée dans certaines cas très rares.

Une protéine de fusion constituée de la forme longue du récepteur de la leptine 30 (OBRL) fusionnée à la EGFP (Enhanced Green Fluorescence Protein) a été utilisée par

Lundin et al (Biochimica et Biophysica Acta, 1499, 130-138, 2000) pour étudier la localisation du récepteur.

L'activation de l'OBR se ferait par l'intermédiaire d'un complexe tétramérique composé de deux janus kinase 2 (JAK2) et de deux OBR. L'activation du récepteur
5 induite par la leptine induirait un changement dans la conformation de l'OBR, qui lui même activerait une JAK2, qui à son tour transphosphorylerait une autre JAK2 puis le récepteur OBR.

L'activation de l'OBR apparaît être responsable de tous les effets connus de la leptine tels que la perte de poids et tous les phénomènes impliqués dans les désordres
10 pondéraux.

Les propriétés inhibitrices de la leptine vis à vis de la synthèse osseuse ont ainsi été récemment mises en évidence. La leptine agit en inhibant l'activité des ostéoblastes, une population de cellules responsables de la formation de l'os.

Modifier la leptinémie pourrait permettre de traiter les maladies liées à une
15 diminution de la densité osseuse comme par exemple l'ostéoporose ou à l'inverse celles liées à une calcification importante.

En 1999 Xu et al (Proc Natl Acad Sci U S A 96, 151-156) ont décrit une méthode de détection des interactions protéine-protéine dans des cellules vivantes. Cette méthode a en outre fait l'objet de la demande de brevet WO99/66324.

20 Cette méthode, appelée BRET (pour Bioluminescent Resonance Energy Transfer ou transfert d'énergie de bioluminescence par résonance), est basée sur un phénomène naturel, l'émission de fluorescence par des organismes marins. La transformation enzymatique, par la luciférase de *Renilla* (Luc), d'un substrat qui peut traverser la membrane génère une bioluminescence, qui à son tour excite un accepteur d'énergie tel que la protéine fluorescente jaune (YFP ou yellow fluorescent protein en anglais).

Cette méthode correspond à la LRET (pour Luminescent Resonance Energy Transfer) décrite par Wang et al (Mol Gen Genet 264 : 578-587 (2001)).

30 L'efficacité du transfert d'énergie dépend de la proximité physique et des orientations respectives de l'accepteur et du donneur. Ainsi la co-expression de la luciférase et de la YFP n'est pas suffisante pour induire un transfert d'énergie car la distance entre les deux partenaires doit être inférieure à 100Å. Afin d'étudier l'interaction entre deux

partenaires d'interaction potentiels la première protéine a été fusionnée à la luciférase et la seconde protéine à la YFP. Si les deux protéines interagissent un transfert d'énergie peut être observé.

Depuis, la méthode de BRET a été mise en œuvre sur un nombre limité de récepteurs, 5 présentant une structure très différente du récepteur de la leptine.

Ainsi quelques auteurs décrivent la mise en œuvre de la méthode sur des récepteurs de la famille des récepteurs couplés aux protéines G (GPCR) tels que les récepteurs β 2 adrénergiques (Angers et al, 2000, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 10:1073), cholesystokines de type A (CCK ;Cheng et al, 2001 . *Biol. Chem.* 276: 48040-48047), 10 et de la thyrotropin releasing hormon (Kroeger et al, 2001, *J. Biol. Chem.* 276: 12736-12743).

Ces récepteurs de taille importante présentent une structure complexe comprenant 7 domaines transmembranaires.

Enfin Boute et al (2001, *Mol Pharmacol* 60: 640-645) ont décrit le suivi de 15 l'activation du récepteur de l'insuline en utilisant le BRET.

Le récepteur de l'insuline est constitué de dimères covalents, et non de complexes non covalents comme le récepteur de la leptine. En outre il comprend une partie intracellulaire assez longue. Enfin les auteurs montrent que le changement de BRET induit par l'insuline ne peut être mis en œuvre que sur le récepteur solubilisé.

20

En quelques dizaines d'années, l'obésité est devenue un problème majeur de santé publique dans les pays industrialisés où elle touche maintenant 20 à 30 % de la population. Ces chiffres devraient encore croître de façon alarmante dans les années à venir. Du fait de ses origines multifactorielles qui prennent leurs sources à des degrés 25 plus ou moins importants parmi des facteurs environnementaux d'une part (comportements alimentaires, accès à la nourriture, dépense énergétique,...) et des origines génétiques multiples d'autre part, l'obésité constitue un véritable défi pour la médecine.

De même les maladies de l'os, telles que l'ostéoporose, touchent une partie de plus en 30 plus importante de la population.

La découverte de nouvelles molécules permettant de traiter les diverses maladies liées au récepteur de la leptine, telles que l'obésité et l'ostéoporose, est donc un enjeu majeur de la santé publique.

Il n'existe cependant pas de procédé de criblage spécifique d'agonistes ou 5 d'antagonistes du récepteur de la leptine pouvant être mis en œuvre à haut flux.

Les demandeurs se sont donc attachés à la mise en œuvre d'un test de criblage rapide, spécifique et efficace d'agonistes ou d'antagonistes du récepteur de la leptine.

10 Ils ont montré de manière surprenante que le changement de BRET induit par la leptine pouvait être mis en œuvre sur l'un des isoformes du récepteur de la leptine, mais qu'elle ne pouvait être mis en œuvre avec tous les isoformes.

15 Ils ont en outre montré que la mise en œuvre du BRET sur le récepteur de la leptine est optimale dans certaines conditions opératoires.

La présente invention est donc relative à un procédé de détection de ligands du récepteur de la leptine par mise en œuvre du transfert d'énergie de résonance entre une première protéine de fusion composée d'un récepteur de la leptine, ou d'une 20 partie substantielle d'un récepteur de la leptine, et d'une protéine donneur d'énergie, ou d'une partie substantielle et active d'une protéine donneur d'énergie, et une seconde protéine de fusion composée d'un récepteur de la leptine, ou d'une partie substantielle d'un récepteur de la leptine, et d'une protéine accepteur d'énergie, ou d'une partie substantielle et active d'une protéine accepteur d'énergie.

25

Elle est en outre relative à des protéines de fusion pour la mise en œuvre de ce procédé, ainsi qu'à des acides nucléiques codant ces protéines.

30 Elle a de plus pour objet un procédé de traitement curatif ou préventif de maladies liées à la leptine consistant à administrer un ligand sélectionné par le procédé défini ci-dessus à un patient atteint par la dite maladie.

Un premier objet de la présente invention est donc une protéine de fusion caractérisée en ce qu'elle est composée d'un récepteur de la leptine, ou d'une partie substantielle d'un récepteur de la leptine et d'une protéine accepteur ou donneur d'énergie, ou
5 d'une partie substantielle et active d'une protéine accepteur ou donneur d'énergie.

Les protéines de fusion selon la présente invention sont composées en substance d'une partie correspondant à une partie ou la totalité de la séquence d'un récepteur de la leptine et d'une partie correspondant à une protéine donneur ou accepteur
10 d'énergie. Elles peuvent néanmoins comprendre d'autres séquences d'acides aminés, issues d'autres protéines, telles que des séquences signal. Ainsi la séquence SEQ ID N°4 est constituée d'une partie de la séquence SEQ ID N°2 et d'autres séquences, et en particulier de la séquence signal de l'interleukine 3 de souris.

15 De manière avantageuse la protéine donneur d'énergie est la luciférase de Renilla. Elle peut néanmoins être toute autre protéine donneur d'énergie telle que le spectre d'émission du donneur chevauche suffisamment le spectre d'excitation de l'accepteur pour permettre un transfert d'énergie efficace entre les deux partenaires. Elle peut ainsi être la GFP, si le transfert d'énergie est le FRET, ou encore l'aequorine si le
20 transfert d'énergie est le CRET. L'aequorine peut être obtenue et utilisée comme décrit dans la demande de brevet EP0 187 519, ou dans l'article de Inouye et al. (PNAS USA 82 : 3154-3158 (1985)).

La protéine fluorescente accepteur d'énergie est quant à elle préférentiellement la
25 DsRed, la GFP ou un mutant de cette protéine, tel que la YFP, l'EYFP, la GFP sauvage, la GFPS65T, ou la Topaz.

Elle peut néanmoins être toute autre protéine fluorescente accepteur d'énergie telle que le spectre d'excitation de l'accepteur et le spectre d'émission du donneur se chevauchent suffisamment pour permettre un transfert d'énergie efficace entre les
30 deux partenaires.

Ces protéines sont connues de l'homme du métier qui peut trouver leurs séquences dans la littérature, notamment dans la revue de Blinks et al. (Pharmacol. Rev. 28 : 1-93 (1976)). En particulier la GFP est décrite par Tsien (Annu. Rev. Biochem. 67 : 509-544 (1998)) et son clonage par Prasher et al. (Gene 111 : 229-233 (1992)). Le 5 clonage de la DsRed est quant à lui décrit par Matz et al. (Nat. Biotechnol. 17 : 969-973 (1999)). Pour la Rluc, l'homme du métier peut se référer à Blinks et al. (Pharmacol. Rev. 28 : 1-93 (1976)) ou encore à Lorenz et al. (PNAS 88: 4438-4442 (1991)).

De manière avantageuse l'isoforme du récepteur de la leptine, compris en totalité ou 10 en partie dans la protéine de fusion, est une isoforme courte, ou présentant un domaine intracellulaire court.

Une telle isoforme comprend avantageusement un domaine intracellulaire Box1, mais ne comprend pas de domaine intracellulaire Box 3.

15 De manière préférentielle cette isoforme est l'isoforme OBRs et encore plus préférentiellement l'isoforme OBRs humain. Cette isoforme peut néanmoins être originaire de toute autre espèce.

Elle peut aussi être toute autre isoforme, préférentiellement courte, et encore plus 20 préférentiellement comprenant au moins le domaine extracellulaire de l'OBR, telle la forme soluble de l'OBR contenant le site de liaison à la leptine décrite par Lee et al (Nature 379, 632-635 (1996)), Gavrilova et al (JBC 272 :30546-30551 (1997)) Maamr. et al. (Endocrinology 142 :4389-4393 (2001)) ou Clement et al. (Nature 392 :398-401 (1998)).

25

Selon un mode de mise en œuvre particulièrement préférentiel l'isoforme est 30 l'isoforme OBRs humaine de séquence SEQ ID °2. Elle peut aussi être un variant de cette protéine présentant une identité d'au moins 65%, préférentiellement d'au moins 75%, et encore plus préférentiellement d'au moins 85% ou 95%, avec la séquence SEQ ID °2.

La protéine de fusion peut ne comprendre qu'une partie de l'isoforme OBRs humaine. Avantageusement elle comprend la partie comprise entre les acides aminés 46 et 866 de la séquence SEQ ID^o2.

- 5 La partie correspondant au récepteur à la leptine peut ainsi présenter la séquence SEQ ID^o4 ou un variant de cette séquence présentant une identité d'au moins 65%, préférentiellement d'au moins 75%, et encore plus préférentiellement d'au moins 85% ou 95%.
- 10 De manière particulièrement avantageuse la protéine de fusion donneur présente la séquence SEQ ID N°6 ou un variant de cette séquence présentant une identité d'au moins 65%.

De manière particulièrement avantageuse la protéine de fusion accepteur présente la séquence SEQ ID N°8 ou un variant de cette séquence présentant une identité d'au moins 65%.

D'autres objets de la présente invention sont des acides nucléiques codant pour ces protéines. De tels acides nucléiques peuvent être des ADN complémentaires ou génomiques, ou des ARN. Ces acides nucléiques ou polynucléotides peuvent être sous forme simple chaîne ou sous la forme de duplex.

Ils sont de manière particulièrement avantageuse des ADN complémentaires.

- 25 De manière préférentielle l'invention a pour objet un acide nucléique ayant une identité d'au moins 65%, préférentiellement d'au moins 75%, et encore plus préférentiellement d'au moins 85% ou 95%, d'identité en nucléotides avec un acide nucléique de séquence SEQ ID N°5 ou SEQ ID N°7.
- 30 Selon encore un autre aspect, l'invention est relative à un acide nucléique hybride, dans des conditions d'hybridation de forte stringence, avec un acide nucléique tel que

défini ci-avant, et plus particulièrement un acide nucléique de séquences nucléotidiques SEQ ID N°5 et SEQ ID N°7, ou un acide nucléique de séquence complémentaire.

5 Le « pourcentage d'identité » entre deux séquences de nucléotides ou d'acides aminés, au sens de la présente invention, peut être déterminé en comparant deux séquences alignées de manière optimale, à travers une fenêtre de comparaison.

La partie de la séquence nucléotidique ou polypeptidique dans la fenêtre de comparaison peut ainsi comprendre des additions ou des délétions (par exemple des « gaps ») par rapport à la séquence de référence (qui ne comprend pas ces additions ou ces délétions) de manière à obtenir un alignement optimal des deux séquences.

Le pourcentage est calculé en déterminant le nombre de positions auxquelles une base nucléique ou un résidu d'aminoacide identique est observé pour les deux séquences (nucléique ou peptidique) comparées, puis en divisant le nombre de 15 positions auquel il y a identité entre les deux bases ou résidus d'aminoacides par le nombre total de positions dans la fenêtre de comparaison, puis en multipliant le résultat par 100 afin d'obtenir le pourcentage d'identité de séquence.

L'alignement optimal des séquences pour la comparaison peut être réalisé de manière informatique à l'aide d'algorithmes connus contenus dans le package de la 20 Société WISCONSIN GENETICS SOFTWARE PACKAGE, GENETICS COMPUTER GROUP (GCG), 575 Science Doctor, Madison, WISCONSIN.

A titre d'illustration, le pourcentage d'identité de séquence pourra être effectué à l'aide du logiciel BLAST (versions BLAST 1.4.9 de mars 1996, BLAST 2.0.4 de février 1998 et BLAST 2.0.6 de septembre 1998), en utilisant exclusivement 25 les paramètres par défaut (S. F Altschul et al, J. Mol. Biol. 1990 215 : 403-410, S. F Altschul et al, Nucleic Acids Res. 1997 25 : 3389-3402). Blast recherche des séquences similaires/homologues à une séquence « requête » de référence, à l'aide de l'algorithme d'Altschul et al. La séquence requête et les bases de données utilisées peuvent être peptidiques ou nucléiques, toute combinaison étant possible.

Par « conditions d'hybridation de forte stringence » au sens de la présente invention, on entendra les conditions suivantes :

1- Compétition des membranes et PRE HYBRIDATION :

-Mélanger : 40µl ADN sperme de saumon (10mg/ml)+ 40 µl ADN placentaire humain (10mg/ml)

5 - Dénaturer 5 mn à 96°C, puis plonger dans la glace le mélange.

- Oter le SSC 2X et verser 4 ml de mix formamide dans le tube d'hybridation contenant les membranes.

- Ajouter le mélange des deux ADNs dénaturés.

10 - Incubation à 42°C pendant 5 à 6 heures, avec rotation.

2- Compétition de la sonde marquée :

- Ajouter à la sonde marquée et purifiée 10 à 50 µl ADN Cot I, selon la quantité de répétitions.

- Dénaturer 7 à 10 mn à 95°C.

15 - Incuber à 65°C pendant 2 à 5 heures.

3- Hybridation :

- Oter le mix de pré hybridation.

- Mélanger 40 µl ADN sperme de saumon + 40 µl ADN placentaire humain ; dénaturer 5 mn à 96°C, puis plonger dans la glace.

20 - Ajouter dans le tube d'hybridation 4 ml de mix formamide, le mélange des deux ADN et la sonde marquée/ADN Cot I dénaturée.

- Incuber 15 à 20 heures à 42°C, avec rotation.

4- Lavages :

- Un lavage à température ambiante dans du SSC 2X, pour rincer.

25 - 2 fois 5 minutes à température ambiante SSC 2X et SDS 0,1% à 65°C.

- 2 fois 15 minutes à 65°C SSC 1X et SDS 0,1% à 65°C.

Envelopper les membranes dans du Saran et exposer.

Les conditions d'hybridation décrites plus haut sont adaptées à l'hybridation
30 dans des conditions de forte stringence, d'une molécule d'acide nucléique d'une longueur variable de 20 nucléotides à plusieurs centaines de nucléotides.

Il va sans dire que les conditions d'hybridation ci-dessus décrites peuvent être adaptées en fonction de la longueur de l'acide nucléique dont l'hybridation est recherchée ou du type de marquage choisi, selon des techniques connues de l'homme du métier.

5 Les conditions convenables d'hybridation peuvent par exemple être adaptées selon l'enseignement contenu dans l'ouvrage de HAMES et HIGGINS (1985, "Nucleic acid hybridization : a practical approach", Hames and Higgins Ed., IRL Press, Oxford) ou encore dans l'ouvrage de F.AUSUBEL et al (1989, Current Protocols in Molecular Biology, Green Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y.).

10

Les protéines objets de la présente invention peuvent être obtenues par tous moyens connus de l'homme du métier. Elles sont néanmoins avantageusement obtenues par expression des acides nucléiques tels que décrits ci-dessus, codant pour ces protéines, éventuellement insérés dans des vecteurs d'expression, dans des cellules 15 avantageusement choisies, suivie éventuellement par une extraction et une purification qui peut être totale ou partielle.

L'invention est également relative à un vecteur recombinant comprenant un acide nucléique selon l'invention.

20 Avantageusement, un tel vecteur recombinant comprendra un acide nucléique choisi parmi les acides nucléiques suivants :

a) un acide nucléique codant pour une protéine ayant au moins 65% d'identité en acides aminés avec une séquence SEQ ID N°6 ou SEQ ID N°8 ou un fragment peptidique ou un variant de cette dernière ;
25 b) un acide nucléique comprenant un polynucléotide ayant une séquence SEQ ID N°5 ou SEQ ID N°7, ou un fragment ou un variant de ce dernier ;
c) un acide nucléique ayant au moins 65% d'identité en nucléotides avec un acide nucléique ayant une séquence SEQ ID N°5 ou SEQ ID N°7 ou un fragment ou un variant de ce dernier ;

d) un acide nucléique hybride, dans des conditions d'hybridation de forte stringence, avec un acide nucléique de séquences SEQ ID N°5 ou SEQ ID N°7, ou un fragment ou un variant de ce dernier.

5 Par « vecteur » au sens de la présente invention on entendra une molécule d'ADN ou d'ARN circulaire ou linéaire qui est indifféremment sous forme de simple brin ou double brin.

10 Selon un mode de réalisation, le vecteur d'expression comprend, outre un acide nucléique conforme à l'invention, des séquences régulatrices permettant d'en diriger la transcription et/ou la traduction.

Selon un mode de réalisation avantageux, un vecteur recombinant selon l'invention comprendra notamment les éléments suivants :

- (1) des éléments de régulation de l'expression de l'acide nucléique à insérer, tels que des promoteurs et des enhanceurs ;
- 15 (2) la séquence codante comprise dans l'acide nucléique conforme à l'invention à insérer dans un tel vecteur, ladite séquence codante étant placée en phase avec les signaux de régulation décrits aux (1) ; et
- (3) des séquences d'initiation et d'arrêt de la transcription appropriées.

20 En outre, les vecteurs recombinants selon l'invention pourront inclure une ou plusieurs origines de réPLICATION chez les hôtes cellulaires dans lesquels leur amplification ou leur expression est recherchée, des marqueurs ou des marqueurs de sélection.

A titre d'exemples, les promoteurs pour cellules eucaryotes comprendront le 25 promoteur de la thymidine kinase du virus HSV ou encore le promoteur de la métallothionéine-L de souris.

De manière générale, pour le choix d'un promoteur adapté, l'homme du métier pourra avantageusement se référer à l'ouvrage de SAMBROOK et al. (1989, "Molecular Cloning : A Laboratory Manual," 2nd ed., Cold Spring Harbor 30 Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.) ou encore aux techniques décrites par

FULLER et al. (1996, *Immunology in Current Protocols in Molecular Biology*, Ausubel et al).

Les vecteurs préférés selon l'invention sont des plasmides, tels que par exemple les vecteurs pCDNA3 (Invitrogen), pQE70, pQE60, pQE9 (Qiagen),
5 psiX174, pBluescript SA, pNH8A, pNH16A, pNH18A, pNH46A, pWLNEO, pSV2CAT, pOG44, pXTI, pSG(Stratagene).

Il peut s'agir également de vecteurs de type *baculovirus* tel que le vecteur pVL1392/1393 (Pharmingen) utilisé pour transfecter les cellules de la lignée Sf9 (ATCC N°CRL 1711) dérivées de *Spodoptera frugiperda*.

10 Il peut encore s'agir de vecteurs adénoviraux tels que l'adénovirus humain de type 2 ou 5.

Un vecteur recombinant selon l'invention peut aussi être un vecteur rétroviral ou encore un vecteur adéno-associé (AAV). De tels vecteurs adéno-associés sont par exemple décrits par FLOTTE et al. (1992, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 7 : 349-356

15

La présente invention a en outre pour objets des cellules comprenant une protéine, un acide nucléique ou un vecteur tels que décrits ci dessus, ou des fragments de ces cellules, des lysats de ces cellules ou encore des membranes de ces cellules.

20 De telles cellules peuvent être cellules isolées d'un organisme et cultivées dans un milieu de croissance adéquat. Elles sont néanmoins préférentiellement des lignées cellulaires. Ainsi de telles lignées sont de manière particulièrement avantageuse les lignées cellulaires HEK 293, COS (ATCC N°CRL 1650), COS-M6 et HeLa (ATCC N°CCL2), ou encore Cv 1 (ATCC N°CCL70), Sf-9 (ATCC N°CRL 1711), CHO
25 (ATCC N°CCL-61) ou 3T3 (ATCC N°CRL-6361).

Les membranes de ces cellules peuvent être préparées par toute méthode connue de l'homme du métier.

Préférentiellement elles seront préparées par broyage mécanique des cellules puis
30 centrifugation des suspensions obtenues, comme illustré dans les exemples qui suivent.

La présente invention est en outre relative à des compositions comprenant des cellules telles que décrites ci dessus et de la saponine.

5 La présente invention est en outre relative à un procédé de détermination de la liaison de composés au récepteur de la leptine comprenant les étapes consistant à :

- mettre en contact ledit composé avec une protéine de fusion donneur d'énergie telle que décrite ci dessus, et une protéine de fusion accepteur d'énergie telle que décrite ci dessus, ou des cellules, ou des fragments, ou des lysats, ou des membranes de cellules

10 comprenant une telle protéine, et un substrat enzymatique adéquat, et

- à mesurer le transfert d'énergie.

Préférentiellement ledit procédé est mis en œuvre avec des cellules traitées par de la saponine.

15 Les protéines de fusion donneur d'énergie et les protéines de fusion accepteur d'énergie sont choisies de manière à ce que l'énergie résultant de l'activation du donneur puisse être transférée de manière efficace à l'accepteur.

Dans un mode de mise en œuvre avantageux dudit procédé, la protéine de fusion
20 donneur d'énergie est une protéine de fusion entre le récepteur de la leptine, ou une partie substantielle du récepteur de la leptine et la luciférase ou une partie substantielle de la luciférase, auquel cas le substrat est avantageusement la coelenterazine.

25 Dans un mode de mise en œuvre préférentiel dudit procédé, la protéine de fusion accepteur d'énergie est une protéine de fusion entre le récepteur de la leptine, ou une partie substantielle du récepteur de la leptine et la YFP ou une partie substantielle de la YFP.

Dans un mode de mise en œuvre avantageux dudit procédé, le transfert d'énergie mesuré en présence du composé à tester est comparé à celui mesuré en absence du composé à tester.

5 Préférentiellement le procédé est mis en oeuvre sur des membranes des cellules, telles que décrites ci dessus.

De manière préférentielle les protéines donneur et accepteur selon la présente invention sont choisies afin que le transfert d'énergie se fasse par résonance BRET, 10 ou LRET. Néanmoins un tel transfert d'énergie peut être effectué par FRET (pour Fluorescent Resonance Energy Transfer ou transfert d'énergie de fluorescence par résonance) ou encore par CRET (pour Chemiluminescent Resonance Energy Transfer ou transfert d'énergie de chimioluminescence par résonance).

Quelque soit le type de transfert d'énergie les couples protéine de fusion donneur/ 15 protéine de fusion accepteur d'énergie sont choisis afin de permettre un tel transfert.

Le CRET consiste en un transfert d'énergie entre l'aequorine, qui est une luciférase, et la GFP.

Le FRET consiste en un transfert d'énergie entre deux protéines de la famille des 20 GFP ayant des spectres différents.

Pour la mise en œuvre de ces transferts l'homme du métier peut se référer à Baubet et al. (PNAS USA 97 : 7260-7265 (2000)) pour la CRET, à Matyus (J Photochem Photobiol B 12: 323-337 (1992)) et Pollok et Heim (Trends Cell Biol 9:57-60 (1999)) pour la FRET.

25

Un autre objet de la présente invention est un procédé de criblage ou de détection de composés destinés à la prévention et / ou au traitement de pathologies liées à la leptine comprenant les étapes consistant à :

30 -mettre en contact ledit composé avec une protéine de fusion donneur d'énergie telle que décrite ci dessus, et une protéine de fusion accepteur d'énergie telle que décrite ci

dessus, ou des cellules en absence ou présence de saponine, ou des fragments, ou des lysats, ou des membranes de cellules comprenant de telles protéines, et éventuellement un substrat enzymatique adéquat, et -à mesurer le transfert d'énergie.

5

Un tel procédé peut être utilisé pour le criblage d'agonistes ou d'antagonistes du récepteur de la leptine.

Le procédé selon la présente invention est compatible avec les plaques à 96 ou 384 10 puits généralement utilisées. Il ne nécessite pas l'utilisation de molécules radioactives, est sensible, reproductible, rapide et le résultat est facile à lire. En effet ce procédé a un bon rapport signal/bruit de fonds et une faible réactivité croisée avec d'autres ligands que la leptine. Ceci s'explique au moins en partie par le fait que la détection de l'activation de l'OBR est directement effectuée au niveau du récepteur, 15 ce qui permet d'éliminer des sources possibles de réactivité croisée à d'autres niveaux des voies de signalisation comme on peut l'observer dans le cas de dosages basés sur des gènes rapporteur ou sur la croissance de cellules.

De plus ce procédé n'est pas limité à une voie de transduction ayant un signal spécifique mais au contraire est susceptible de détecter toutes les molécules 20 interagissant avec les OBR.

Cette caractéristique est particulièrement intéressante pour la mise en oeuvre de criblage à grande échelle, puisque de plus en plus de ligands de récepteurs membranaires s'avèrent activer certaines voies mais pas d'autres voies.

25 La présente invention est en outre relative à l'utilisation de composés sélectionnés par un procédé consistant à :

-mettre en contact ledit composé avec une protéine de fusion donneur d'énergie, et une protéine de fusion accepteur d'énergie telle que décrite ci-dessus, ou des cellules, ou des fragments, ou des lysats, ou des membranes de cellules comprenant une telle 30 protéine, et éventuellement un substrat enzymatique adéquat, et -à mesurer le transfert d'énergie,

pour la fabrication d'un médicament pour le traitement curatif ou préventif de maladies liées à la leptine ou à son récepteur.

Elle a enfin pour objet un procédé de traitement curatif ou préventif de maladies liées

5 à la leptine ou à son récepteur comprenant les étapes de:

-élection dudit composé par un procédé consistant à :

+mettre en contact ledit composé avec une protéine de fusion donneur d'énergie et une protéine de fusion accepteur d'énergie, ou des cellules, ou des fragments, des lysats, ou des membranes de cellules comprenant une telle protéine, et un substrat

10 enzymatique adéquat, et

+à mesurer le transfert d'énergie, et

-d'administration dudit composé à un patient atteint par la dite maladie.

15 De telles maladies peuvent être des maladies liées à une diminution de la densité osseuse comme par exemple l'ostéoporose ou à l'inverse celles liées à une calcification importante.

Elles peuvent aussi être des maladies ayant un effet sur le poids, telles que l'obésité, le diabète ou l'anorexie.

20 Les composés de l'invention peuvent être formulés dans des compositions pharmaceutiques en vue d'une administration par voie topique, orale, parentérale, intranasale, intraveineuse, intramusculaire, sous-cutanée, intraoculaire, etc. Préférentiellement, les compositions pharmaceutiques contiennent des véhicules pharmaceutiquement acceptables pour une formulation injectable. Il peut s'agir en

25 particulier de solutions salines (phosphate monosodique, disodique, chlorure de sodium, potassium, calcium ou magnésium, etc, ou des mélanges de tels sels), stériles, isotoniques, ou de compositions sèches, notamment lyophilisées, qui, par addition selon le cas d'eau stérilisée ou de sérum physiologique, permettent la constitution de solutés injectables.

Enfin le procédé selon la présente invention permet aussi le criblage de sérum de patients obèses pour la présence ou l'absence de leptine non fonctionnelle ou encore le criblage de molécules interférant avec la dimérisation de l'OBR.

5 La figure 1 représente schématiquement les protéines de fusion. Box1 représente le site de liaison de JAK2; Box3 représente le site de liaison des protéines STAT; TM représente le domaine trans-membranaire.

Les figures 2a et 2b illustrent l'expression des constructions OBR dans des cellules
10 COS estimée par des expériences de radio-marquage utilisant la ¹²⁵I-leptine comme radio-ligand. Dans les figures 2a et 2b le contenu cellulaire total en OBR et le pourcentage de sites de liaison à la surface des cellules sont respectivement mesurés.
La figure 2c illustre la localisation cellulaire de l'expression des constructions OBRl-YFP et OBRs-YFP en présence et en absence de leptine.
15 La figure 2d illustre l'activation de JAK2 par différentes constructions OBR.
La figure 2e illustre l'effet de la stimulation par la leptine de cellules co-exprimant le gène rapporteur pour STAT3 et différentes constructions OBR.

20 La figure 3 illustre la dimérisation constitutive de OBR. Des cellules HEK 293 exprimant les différentes constructions OBR indiquées sont incubées en présence de coelenterazine. Le transfert d'énergie est mesurée à l'aide d'un luminomètre.

Les figures 4a et 4b illustrent l'effet de la liaison de la leptine sur le BRET constitutif des OBR.
25 Figure 4a: des cellules HeLa exprimant les différentes constructions OBR indiquées sont incubées en présence de leptine avant d'initier la réaction de la luciférase. Le transfert d'énergie est mesurée à l'aide d'un luminomètre.
Figure 4b: L'effet de la leptine est comparé dans des cellules entières co-exprimant OBRs-Luc et OBR-YFP, en absence ou présence de saponine, dans des lysats totaux
30 et dans des préparations membranaires.

Les figures 5a à 5e illustrent l'optimisation et la caractérisation du changement du BRET induit par la leptine sur les OBRs. Des membranes préparées à partir de cellules HeLa ou COS co-exprimant OBRs-Luc et OBRs-YFP ont été pré-incubées avec ou sans leptine avant d'initier la réaction de la luciférase.

5 Figure 5a: Optimisation des niveaux d'expression de OBRs-Luc et de OBRs-YFP relatifs et absolus.

Figure 5b : Variation du signal de BRET induit par la leptine en fonction du temps.

Figure 5c : Courbes dose-réponse BRET/concentration en leptine sur membrane et cellules intacte en présence de saponine (0.05%).

10 Figure 5d : Compétition de la liaison de la ^{125}I -leptine par augmentation des concentrations croissantes de la leptine.

Figure 5e: Spécificité des changements de BRET induits par la leptine. Les membranes ont été pré-incubées avec des concentrations saturantes d'érythropoïétine (EPO, 10U /ml), de trombopoïétine (TPO, 10 nM), de granulocyte macrophage

15 colony stimulating factor (GM-CSF, 250 ng/ml), d'interleukine 3 (IL3, 280 ng/ml), d'interleukine 6 (IL6, 100 ng/ml), de prolactine (PRL, 200 ng/ml), de stem cell factor α (SCF α , 250 ng/ml), d'epidermal growth factor (EGF, 100 ng/ml), d'insuline (Ins, 100 nM), de lipopolysaccharide (LPS, 100 ng/ml) et de tumor necrosis factor α (TNF α , 50ng/ml).

20 Figure 6 : Co-transfектées de cellules COS avec une quantité constante d'OB-Rs-Luc (50ng) et une quantité croissante d'OB-Rs-YFP : \circ , 200 ng ; \bullet , 400 ng ; Δ , 800 \blacklozenge , 1600 ; \lozenge , 3200. Les mesures de BRET ont été faites sur les cellules en présence de saponine (0,015%), incubées ou non avec des doses croissantes de leptine, et sont exprimées en mBRET.

25

La présente invention est illustrée sans pour autant être limitée par les exemples qui suivent.

Matériels et Méthodes utilisés dans les exemples

30

Constructions plasmidiques, transfactions et culture cellulaire.

Les protéines de fusion OB-R-YFP et OB-R-Luc ont été construites par ligation de la YFP et de Luc à l'extrémité C-terminale des récepteurs par des techniques classiques de biologie moléculaire. Les régions codantes de YFP obtenues à partir du vecteur pGFPtpz-N1 Cytogem®-Topaze (Packard, Meriden, CT) ont été insérées dans le site 5 EcoRV de pcDNA3/CMV (Invitrogen, Groningen, Netherlands) qui contient un site polylinker modifié. La région codante de *Renilla luciferase* a été obtenue à partir de pRL-CMV (Promega, Madison, WI) et insérée dans le site EcoRV du pcDNA3modifié. Les régions codantes de OBRI et OBRs (don de Dr. Gainsford, Royal Melbourne Hospital, Victoria, Australia) ont été insérées dans les deux 10 vecteurs décrits ci dessus, respectivement dans les sites de clonage EcoR1/BamH1 et Nhe1. Les codons Stop ont été déletés par mutagenèse dirigée et la phase de la protéine de fusion a été ajustée.

Les lignées cellulaires HEK 293, COS-M6 et HeLa ont été cultivées dans du DMEM complété avec les composants suivants : 10% (v/v) FBS, 4.5 g/litre glucose, 100 U/ml 15 pénicilline, 0.1 mg/ml streptomycine, 1 mM glutamine (Life Technologies, Gaithersburg, MD).

Les transfections transitoires ont été effectuées en utilisant le réactif de transfection FuGene 6 (Roche, Bale, Suisse).

20 **Microscopie par Fluorescence.**

Deux jours après la transfection avec les constructions YFP, les cellule ont été incubées avec 100 nM leptine durant 60 min et 0.01 mM bis-benzamidine durant 15 min avant d'être lavées dans du PBS et fixées durant 20 min à température ambiante dans une solution froide de 4% paraformaldéhyde dans du PBS. Les coupes sont 25 observées par microscopie fluorescente en utilisant des filtres FITC et DAPI.

Préparation des membranes et solubilisation.

Les cellules ont été placées dans la glace, lavées deux fois dans du PBS à la température de la glace et détachées de manière mécanique dans un tampon 1 (5 mM 30 Tris, 2 mM EDTA, pH 7.4, 5 mg/litre d'inhibiteur de la trypsine de soja, 5 mg/litre de leupeptin, et 10 mg/litre de benzamidine) à la température de la glace.

Les suspensions cellulaires sont homogénéisées avec un homogénéiseur Polytron (Janke & Kunkel Ultra-Turrax T25) trois fois durant 5 sec. Le lysat est centrifugé à 450 X g durant 5 min à 4°C et le surnageant est centrifugé à 48000 X g durant 30 min à 4°C. Le culot final est lavé deux fois dans du tampon 1 et resuspendu dans une 5 solution (75 mM Tris (pH 7.4), 12.5 mM MgCl₂, 5 mM EDTA avec des inhibiteurs de protéases, comme décrits ci dessus) et immédiatement utilisé dans des expériences de liaison de ligands radioactifs ou des expériences de BRET.

Immunoprecipitation de JAK2

10 Des cellules HeLa ont été co-transfектées avec des plasmides exprimant JAK2 marquée par HA2 (don de Dr. Wojchowski, Pennsylvania State University, Pennsylvania, USA) et des plasmides contenant différentes constructions d'OBR. Les cellules ont été lysées dans du tampon de lyse (10 mM Tris, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 5% glycerol, 0,02% NaN₃, NP40 0,1%, orthovanadate 1mM, 5 mg/litre 15 d'inhibiteur de la trypsine de soja et 10 mg/litre de benzamidine) et centrifugées durant 15 min à 13000 rpm. La fraction soluble a été immunoprecipitée durant 2h avec un anticorps polyclonal anti-JAK2 (HR-758) (1µg/ml) (Santa-Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA).

20 Immunoabsorption SDS-Page

Les immunoprecipitats JAK2 ont été dénaturés dans la solution (62.5 mM Tris/HCl (pH 6.8), 5% SDS, 10% glycerol et 0.05% bleu de bromophénol), à 100°C durant 10 minutes. Les protéines ont été séparées par SDS-PAGE en 7 % de poly-acrylamide et transférées sur nitrocellulose. L'immuno-détection a été effectuée avec un anticorps 25 anti-phosphotyrosine 4G10 (2 µg/ml) (Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY). L'immunoréactivité a été révélée en utilisant un anticorps secondaire approprié couplé à la peroxydase de raifort et le réactif chimio-luminescent ECL (Amersham, Aylesbury, UK).

30 Test de liaison de la ¹²⁵I-leptine

Des cellules transfectées ont été carencées en sérum dans du DMEM (1% BSA) 24 h avant les expériences de liaison. Pour mesurer la liaison de la leptine à la surface des cellules, des cellules ont été lavées deux fois avec du PBS à la température de la glace et incubées dans un tampon de liaison (DMEM, 25 mM Hepes pH 7.4, 1% BSA) 5 contenant 100000 cpm/puits de ^{125}I -leptine (PerkinElmer life sciences, Paris, France) en absence ou en présence de 200 nM de leptin non radioactive (leptine humaine recombinante (PeproTech Inc, USA) durant 4 h à 4°C. Les cellules ont été lavées deux fois avec du PBS à la température de la glace, lysées dans 1N NaOH et la radioactivité déterminée dans un compteur à radiations gamma. Afin de mesurer la 10 quantité totale de leptine se liant dans l'extrait, les cellules ont été mises en suspension dans 1.5 ml de tampon de liaison contenant 0.15% de digitonine durant 2h à 4°C. Les extraits ont été centrifugés durant 30 min dans une centrifugeuse Eppendorf à vitesse maximale à 4°C. Le surnageant (0.2 ml) a été incubé avec 100000 cpm de ^{125}I -leptine en présence ou en absence de 200 nM de leptine dans un 15 volume total de 0.25 ml avec agitation toute la nuit à 4°C.

0.5 ml de γ -globuline (1.25 mg/ml) et 0.5 ml de polyethylene glycol 6000 (25% p/v) ont été ajoutés pour précipiter les complexes récepteur-ligand, qui sont obtenus par centrifugation (17000 x g durant 3 min). Le culot est lavé avec 1 ml de polyéthylène glycol 6000 12 % (p/v) puis compté.

20

Activation du gène rapporteur

Des cellules HeLa ont été co-transfectées avec 2.6 μg de plasmide portant le gène rapporteur STAT3 (don de Dr. Levy, New York University, New York, USA), 200 pg de pcDNA3 comprenant la région codante de la Renilla luciferase (utilisée comme 25 témoin interne) et avec 1.4 μg des différentes constructions OBR ou avec le véhicule seul. 48 heures après la transfection, les cellules ont été carencées durant la nuit en DMEM (1% BSA) avant la stimulation par 1nM de leptine durant 6 - 8 heures. Les cellules ont alors été lavées et lysées dans un tampon de lyse passive (Promega Corporation, Madison, WI) durant 15 minutes à température ambiante. Les lysats 30 totaux ont été centrifugé durant 2 minutes à 15000 rpm et les surnageants ont été utilisés dans un test de dosage de la Luciferase ((Promega Corporation, Madison,

WI) en utilisant un luminomètre Berthold (Lumat LB 9507). Les résultats sont exprimés par le rapport des activités luciférase de luciole ((firefly) / luciférase de *Renilla*.

5 **Mesure de BRET**

48 heures après la transfection des cellules HeLa, COS et HEK 293 exprimant OBR ont été détachées et lavées avec du PBS. $1-2 \times 10^5$ cellules ont été distribuées dans des plaques optiques à 96 puits (Packard Instrument Company, Meriden, CT) en absence ou en présence de ligands, à 25°C. Des membranes préparées à partir de cellules exprimant OBR ont été utilisées pour les mesures de BRET. Le substrat, la coelenterazine h (Molecular Probes, Eugene, OR) est ajouté à une concentration finale de 5 μ M et la lecture est faite avec un fluoro/luminomètre FusionTM (Packard Instrument Company, Meriden, CT) qui permet l'intégration séquentielle des signaux de luminescence détectés avec deux filtres (filtre Luc: 485 \pm 10 nm; filtre YFP: 530 \pm 12.5 nm). Le rapport BRET est défini comme la différence de l'émission à 530 nm/485 nm des protéine de fusion Luc et YFP co-transfектées et l'émission à 530 nm/485 nm de la protéine de fusion Luc seule. Les résultats sont exprimés en unités milliBRET (mBU), 1 unité mBRET correspondant à la valeur du rapport BRET multiplié par 1000. Les ligands suivants ont été utilisés pour déterminer la spécificité du dosage: érythropoïétine humaine recombinante (EPO), insuline (Ins) , lipopolysaccharide (LPS, Sigma Aldrich, St Louis, USA), trombopoïétine Humaine recombinante (TPO), GM-CSF, interleukine 3 (IL3), interleukine 6 (IL6), prolactine (PRL), SCF, EGF et TNF α .

25

Exemple 1 : Expression fonctionnelle des protéines de fusion OBR

La forme longue (OBRI) et la forme courte (OBRs) des OBR on été fusionnées à leurs extrémités C-terminale avec la YFP ou la Luc (Fig. 1). L'expression de ces protéines de fusion a été confirmée dans des cellules COS transfectées dans des expériences de liaison avec la 125 I-leptin (Fig. 2a). Des résultats similaires ont été obtenus dans des cellules HeLa transfectées.

L'expression à la surface des cellules des protéines de fusion et des récepteurs de type sauvage exprimés dans les cellules COS varient entre 5 et 10 %, ce qui est en accord avec des valeurs déjà décrites. Des valeurs similaires sont obtenues dans des cellules HEK 293 exprimant des OBR endogènes ($14 \pm 3\%$).

5 La localisation des protéines de fusion OBR dans les cellules HeLa a été étudiée par microscopie de fluorescence en utilisant les protéines de fusion avec YFP. La fluorescence due à OBRI-YFP est repartie ponctuellement dans les cellules tandis que celle due à OBRs-YFP est localisée dans des plaques. La stimulation par la leptine localise OBRI-YFP dans de grandes plaques intracellulaires correspondant
10 probablement au compartiment endosomal. La localisation de OBRs-YFP ne change pas de manière significative. Les résultats obtenus par microscopie à fluorescence confirment la localisation prédominante de OBR dans le compartiment intracellulaire et sont cohérents avec la localisation déjà décrite de la protéine de fusion OBRI-GFP dans des cellules COS.

15 L'expression fonctionnelle des protéines de fusion est évaluée par mesure de l'activation de la voie JAK-STAT. Les kinases JAK2 sont associées avec les domaines intracellulaires de OBRs et OBRI. La liaison de ligands induit la transphosphorylation de JAK2 et la phosphorylation de OBRI mais pas d'OBRs. OBRI phosphorylé fournit ensuite un site d'accrochage pour les protéines STAT, qui sont activées par phosphorylation de la tyrosine après liaison au récepteur. Les protéines
20 STAT activées dimérisent alors et sont transloquées au noyau où elles stimulent la transcription de gènes par l'intermédiaire d'éléments de réponse au STAT comme décrit par Tartaglia (1997, J Biol Chem 272, 6093-6096).
Comme le montre la figure 2c toutes les constructions OBRs induisent la phosphorylation de JAK2 ce qui indique une activation de JAK2. L'activité du gène rapporteur STAT3 est activée d'un facteur 2-4 par OBRI-wt et les protéines de fusion OBRI tandis que les isoformes courtes n'ont pas d'effet sur l'activité du gène rapporteur. Ces résultats indiquent que les protéines de fusion OBR sont fonctionnellement exprimées dans les cellules HeLa.

25

La dimérisation de OBR-Luc et OBR-YFP a été étudiée dans des cellules vivantes. Des transferts d'énergie significatifs ont été observés entre OBRs-Luc et OBRs-YFP ainsi qu'entre OBRI-Luc et OBRI-YFP, exprimés dans des quantités équimolaires, ce qui indique que des homo-dimères constitutifs existent pour les deux récepteurs (Fig. 5 3 a, b). L'existence des hétéro-dimères OBRs/OBRI dans les cellules vivantes est démontrée par la détection de BRET entre OBRs-Luc et OBRI-YFP ainsi qu'entre OBRI-Luc et OBRs-YFP. La spécificité de ces interactions est illustrée par l'absence de transfert significatif entre OBRs-Luc et OBRI-Luc et une protéine fusion entre l'YFP et le récepteur de l'insuline décrite récemment (Boute et al., 2001 10 précédemment cités).

Ces résultats indiquent que les isoformes courtes et longues sont impliqués dans des hétéro et homo complexes dans les cellules vivantes.

Exemple 3: Effet de la liaison de la leptine sur le BRET constitutif des OBR :

15 Afin d'évaluer les effets agonistes sur le BRET constitutif, les cellules ont été pré-incubées avec la leptine avant d'initier la réaction de la luciférase avec son substrat. Aucun changement dans le BRET constitutif n'est observé avec les homodimères OBRI et les deux combinaisons d'hétéro dimères OBRs/OBRI alors que le BRET est augmenté avec les homo dimères OBRs (Fig. 4 a).

20 Les changements de BRET des homo dimères OBRs induits par la leptine ont ensuite été mesurés dans différentes préparations cellulaires. La rupture mécanique des cellules dans un tampon hypotonique améliore de manière significative l'augmentation du BRET par la leptine tandis que le BRET basal reste inchangé.

25 Des résultats similaires ont été obtenus avec la fraction membranaire après séparation du cytosol. Tandis que tous les couples OBRs-Luc/OBRs-YFP contribuent au BRET basal, seuls les récepteurs exposés à la surface de la cellule (5–10 %) peuvent être stimulés par la leptine qui est imperméable aux membranes dans des cellules intactes. La disruption des membranes cellulaires augmente la fraction d'OBR accessible à la 30 leptine et qui est responsable de l'augmentation du BRET induit par la leptine.

Des résultats similaires ont été obtenus sur cellules traitées avec la saponine. Ce composant fait des trous dans les membranes et permet la pénétration des protéines comme la leptine dans les compartiments intracellulaires où se trouve la majorité des OBRs.

5 Aucun changement de BRET induit par la leptine n'a été observé dans des expériences analogues effectuées avec des préparations à partir de cellules exprimant des homo-dimères OBRI –ou des hétéro-dimères OBRs/OBRI.

Les quantités de et les rapports de OBRs-Luc et OBRs-YFP ont ensuite été modulés afin d'optimiser le BRET induit par la leptine (Fig. 5a). Les meilleurs résultats sont 10 obtenus quand 500 ng d'ADN codant pour OBRs-Luc et 250 ng d'ADN codant pour OBRs-YFP sont utilisés.

Dans ces conditions optimisées une concentration saturée de leptine induit une augmentation d'un facteur 2 – 2.5 du signal BRET basal dans des cellules incubées avec la saponine ou membranes préparées à partir de cellules exprimant des homo- 15 dimères OBRs. Cette augmentation est fonction du temps. Les valeurs maximales sont atteintes après 20 minutes d'incubation avec 1nM leptine à température ambiante (Fig. 5b). Pour des concentrations supérieures en leptine, les valeurs maximales sont obtenues après 5 minutes d'incubation à température ambiante.

L'effet de la leptine est dose-dépendant avec un EC50 d'environ 100 pM (Fig. 5c), 20 ce qui est en accord avec les valeurs de Ki obtenues avec les protéines de fusion OBRs-Luc (116 pM) et OBRsYFP (35 pM) (Fig 5 d). La spécificité du test est démontrée par l'absence de BRET induite par le ligand par une concentration saturante de plusieurs cytokines et d'autres ligands de récepteurs membranaires tels que l'érythropoïétine, la trombopoïétine, le GM-CSF, l'IL3, l'IL6, la PRL, le SCFa, 25 l'EGF, l'insuline, le LPS et le TNFa.

La répartition des récepteurs en dimères suit des lois statistiques, et à un rapport 1/1 en nombre de récepteurs on s'attend à la répartition suivante si tous les récepteurs sont sous forme dimérique: 1/4 Luc/Luc, 1/4 YFP/YFP et 1/2 de récepteurs capables 30 d'engendrer un signal de BRET (1/4 Luc/YFP, 1/4 YFP/Luc). Cependant lors des mesures de BRET, l'ensemble des molécules fusionnées à la Luc donnent un signal de luminescence et donc à un rapport 1/1 on observe la moitié des récepteurs capables

de BRET, sur une population donneuse totale. Aussi, pour augmenter le signal de BRET, on a réalisé des expériences de saturation des molécules Luc par les molécules YFP de façon à avoir l'ensemble des molécules Luc sous forme de dimères avec les molécules YFP (capables de BRET). Les résultats de la figure 6, montrent que le
5 signal de BRET basal augmente lors de la saturation et que l'induction par la leptine est proportionnelle au signal basal, avec une stimulation de 2-2,5 fois le BRET basal. A saturation on obtient une meilleure résolution du BRET basal et induit, permettant un criblage plus aisé pour la recherche de molécules.

REVENDICATIONS

1. Protéines de fusion caractérisée en ce qu'elle est composée d'un récepteur de la leptine présentant un domaine intracellulaire court ou d'une forme soluble d'un tel récepteur contenant le site de liaison à la leptine., ou d'une partie substantielle d'un tel récepteur de la leptine, et d'une protéine donneur d'énergie ou accepteur d'énergie, ou d'une partie substantielle et active d'une protéine donneur d'énergie ou accepteur d'énergie.
5
2. Protéine de fusion selon la revendication 1 caractérisée en ce que le récepteur de la leptine est une isoforme courte.
10
3. Protéine de fusion selon la revendication 1 caractérisée en ce que le récepteur de la leptine est une isoforme comprenant un domaine intracellulaire Box1, mais ne comprenant pas de domaine intracellulaire Box 3.
15
4. Protéine de fusion selon l'une des revendications 1 à 3 caractérisée en ce que le récepteur de la leptine est l'isoforme OBRs.
20
5. Protéine de fusion selon l'une des revendications 1 à 4 caractérisée en ce que le récepteur de la leptine est l'isoforme OBRs humaine de séquence SEQ ID N°2, ou un variant de ce récepteur présentant une identité d'au moins 65% avec la séquence SEQ ID N°2
25
6. Protéine de fusion selon l'une des revendications 1 à 4 caractérisée en ce que la séquence du récepteur de la leptine est la séquences des acides aminés 46 à 866 de l'isoforme OBRs humaine de séquence SEQ ID N°2, ou un variant de cette séquence présentant une identité d'au moins 65%.

7. Protéine de fusion selon l'une des revendications 1 à 4 caractérisée en ce que le récepteur de la leptine présente la séquence SEQ ID N°4, ou un variant de cette séquence présentant une identité d'au moins 65%.

5

8. Protéine de fusion selon l'une des revendications 1 à 7 caractérisée en ce que la protéine est une luciférase.

9. Protéine de fusion selon l'une des revendications 1 à 7 caractérisée en ce que la protéine est la GFP ou un mutant de cette protéine ou la DsRed

10

10. Protéine de fusion selon l'une des revendications 1 à 7 caractérisée en ce que le mutant de la GFP est la YFP, l'EYFP, la GFP sauvage, la GFP S65T, ou la Topaz.

15

11. Protéine de fusion selon l'une des revendications 1 à 7 caractérisée en ce qu'elle présente la séquence SEQ ID N°6 ou un variant de cette séquence présentant une identité d'au moins 65%.

20

12. Protéine de fusion selon l'une des revendications 1 à 7 caractérisée en ce qu'elle présente la séquence SEQ ID N°8 ou un variant de cette séquence présentant une identité d'au moins 65%.

25

13. Acide nucléique codant pour l'une des protéines selon l'une des revendications 1 à 12.

14. Acide nucléique selon la revendication 13 caractérisé en ce qu'il présente la séquence SEQ ID N°5.

30

15. Acide nucléique selon la revendication 13 caractérisé en ce qu'il présente la séquence SEQ ID N°7.

16. Acide nucléique présentant une identité d'au moins 65% avec une séquence selon l'une des revendications 14 et 15.
- 5 17. Acide nucléique hybridant dans des conditions de forte stringence avec une séquence selon l'une des revendications 14 et 15.
18. Cellule comprenant un acide nucléique selon l'une des revendications 13 à 17.
- 10 19. Cellule exprimant une protéine selon l'une des revendications 1 à 12
20. Fragments de cellules selon l'une des revendications 18 et 19.
21. Lysat de cellules selon l'une des revendications 18 et 19.
- 15 22. Membranes de cellules selon l'une des revendications 18 et 19.
23. Composition comprenant des cellules selon l'une des revendications 18 et 19 et de la saponine.
- 20 24. Procédé de détermination de la liaison de composés au récepteur de la leptine comprenant les étapes consistant à :
 - mettre en contact ledit composé avec une protéine de fusion donneur d'énergie selon l'une des revendications 1 à 12, et une protéine de fusion accepteur d'énergie selon l'une des revendications 1 à 12, ou des cellules, ou des fragments, ou des lysats, ou des membranes de cellules comprenant une telle protéine, et éventuellement un substrat enzymatique adéquat, et
 - à mesurer le transfert d'énergie.
- 25 25. Procédé selon la revendication 24 caractérisé en ce que la protéine de fusion donneur d'énergie est une protéine de fusion entre le récepteur de la leptine,

ou une partie substantielle du récepteur de la leptine et la luciférase ou une partie substantielle de la luciférase.

26. Procédé selon la revendication 24 caractérisé en ce qu'il est mis en œuvre
5 avec les cellules traitées avec de la saponine

27. Procédé selon la revendication 24 caractérisé en ce que la protéine de fusion
accepteur d'énergie est une protéine de fusion entre le récepteur de la leptine,
ou une partie substantielle du récepteur de la leptine et la YFP ou une partie
10 substantielle de la YFP.

28. Procédé selon la revendication 24 caractérisé en ce que le substrat est la
coelenterazine.

15 29. Procédé selon la revendication 24 caractérisée en ce que le transfert d'énergie
mesuré en présence du composé à tester est comparé à celui mesuré en
absence du composé à tester.

20 30. Procédé de criblage ou de détection de composés destinés à la prévention et /
ou au traitement de pathologies liées à la leptine comprenant les étapes
consistant à :
-mettre en contact ledit composé avec une protéine de fusion donneur d'énergie
selon l'une des revendications 1 à 12, et une protéine de fusion accepteur
d'énergie selon l'une des revendications 1 à 12, ou des cellules, ou des fragments,
25 ou des lysats, ou des membranes de cellules comprenant une telle protéine, et
éventuellement un substrat enzymatique adéquat, et
-à mesurer le transfert d'énergie.

30 31. Procédé de criblage d'agonistes ou d'antagonistes du récepteur de la leptine
comprenant les étapes consistant à :

-mettre en contact les agonistes ou d'antagonistes potentiels avec une protéine de fusion donneur d'énergie selon l'une des revendications 1 à 12, et une protéine de fusion accepteur d'énergie selon l'une des revendications 1 à 12, ou des cellules, ou des fragments, ou des lysats, ou des membranes de cellules comprenant une telle protéine, et éventuellement un substrat enzymatique adéquat, et
5 -à mesurer le transfert d'énergie.

32. Utilisation de composés sélectionnés par un procédé consistant à :

-mettre en contact ledit composé avec une protéine de fusion donneur d'énergie selon l'une des revendications 1 à 12 et une protéine de fusion accepteur d'énergie selon l'une des revendications 1 à 12, ou des cellules, ou des fragments, ou des lysats, ou des membranes de cellules comprenant une telle protéine, et un éventuellement substrat enzymatique adéquat, et
10 -à mesurer le transfert d'énergie,
15 pour la fabrication d'un médicament pour la traitement curatif ou préventif de maladies liés à la leptine, ou à son récepteur.

33. Procédé de traitement curatif ou préventif de maladies liés à la leptine, ou à son récepteur, comprenant les étapes:

20 -de sélection dudit composé par un procédé consistant à :
+mettre en contact ledit composé avec une protéine de fusion donneur d'énergie selon l'une des revendications 1 à 12, et une protéine de fusion accepteur d'énergie selon l'une des revendications 1 à 12, ou des cellules, ou des fragments, ou des lysats, ou des membranes de cellules comprenant une telle protéine, et un éventuellement substrat enzymatique adéquat, et
25 +à mesurer le transfert d'énergie, et
-d'administration dudit composé à un patient atteint par la dite maladie

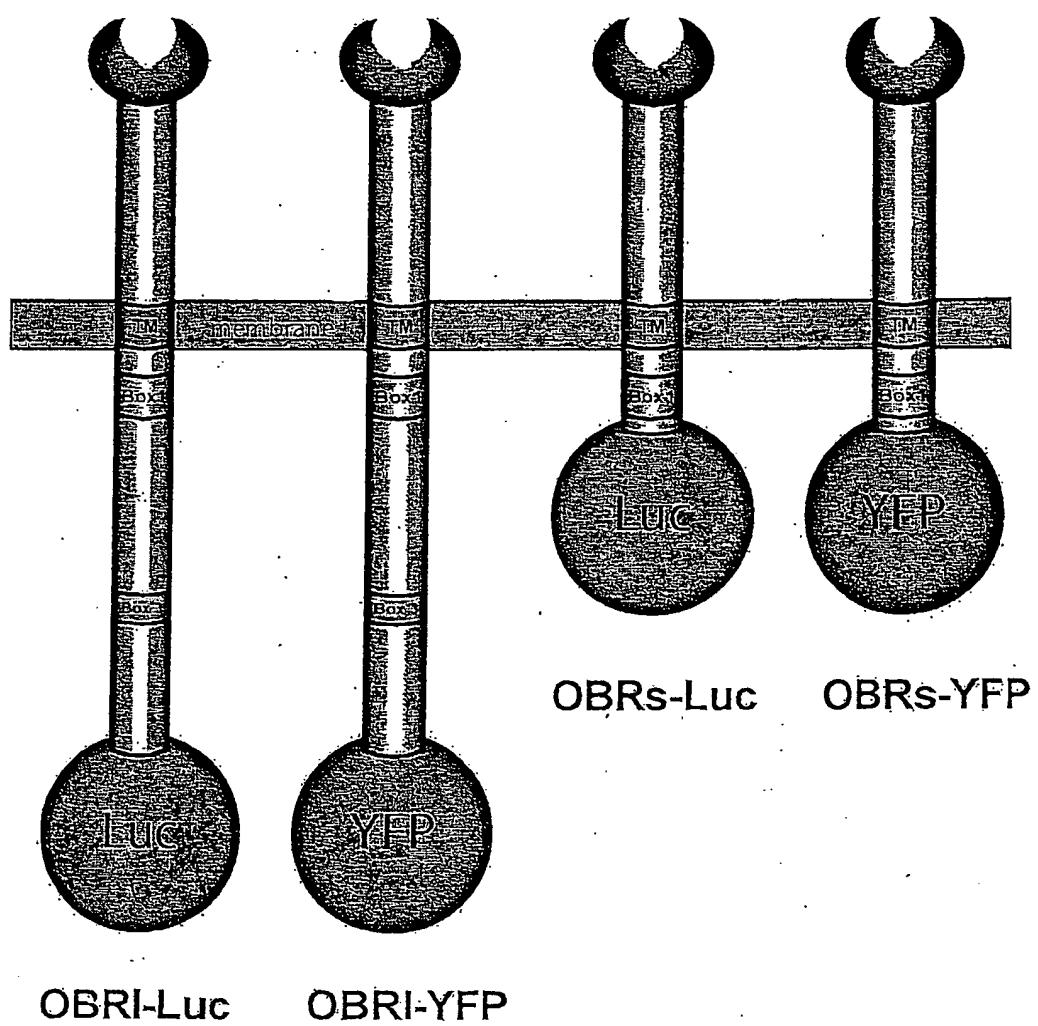
Figure 1

FIGURE 2A

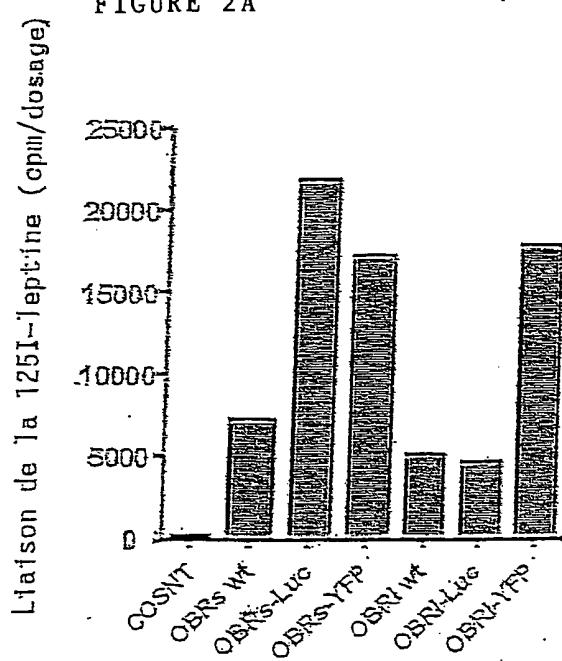


Figure 2B

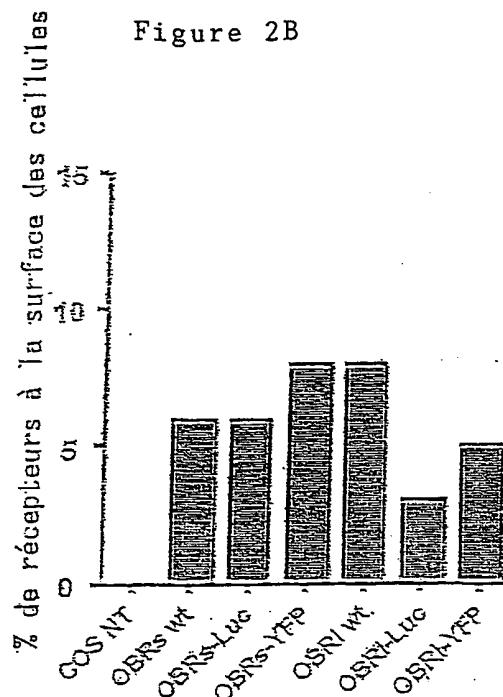
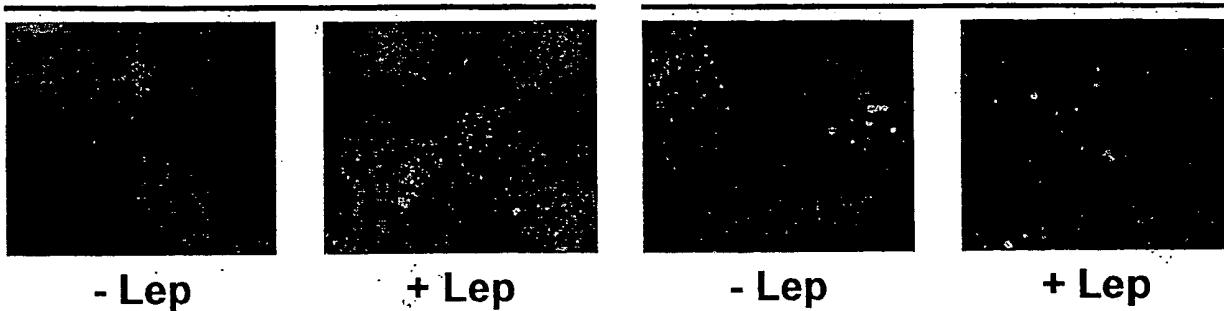
FIGURE 2C
OBRI-YFP

FIGURE 2D

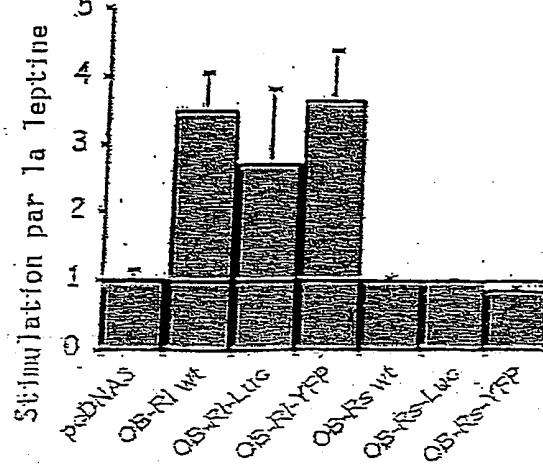
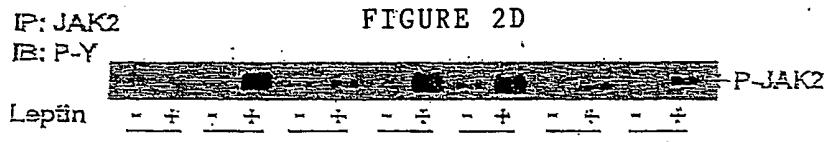
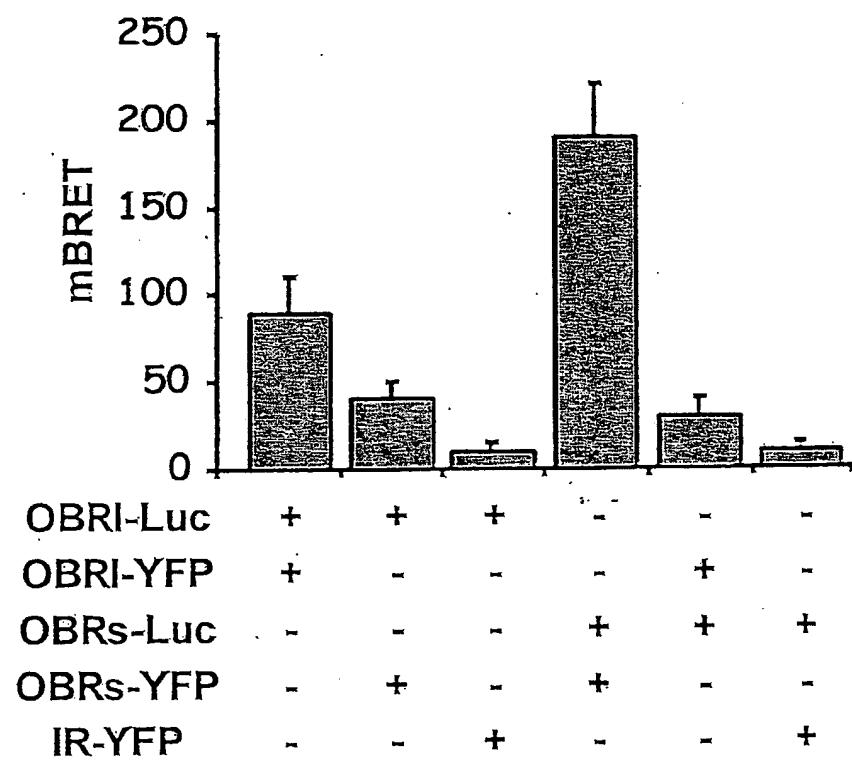


FIGURE 2E

Figure 3

4/6

FIGURE 4A

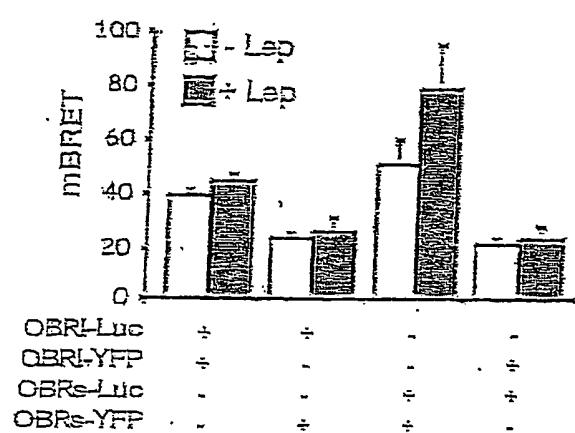


FIGURE 4B

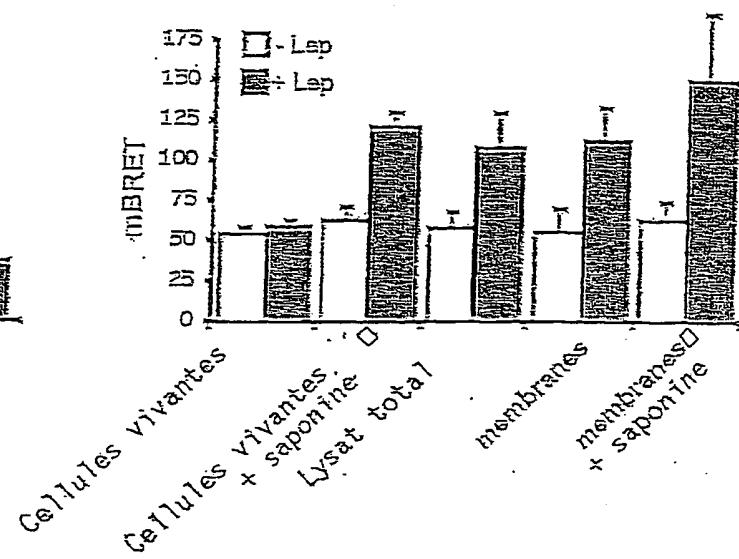


FIGURE 5A

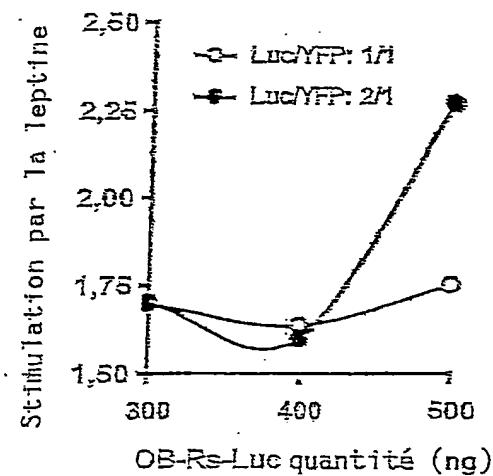


FIGURE 5B

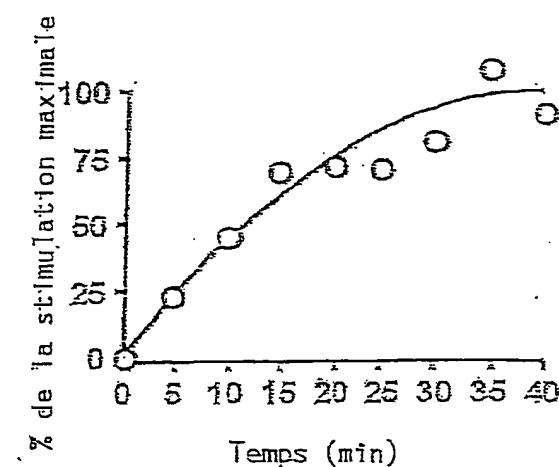


FIGURE 5C

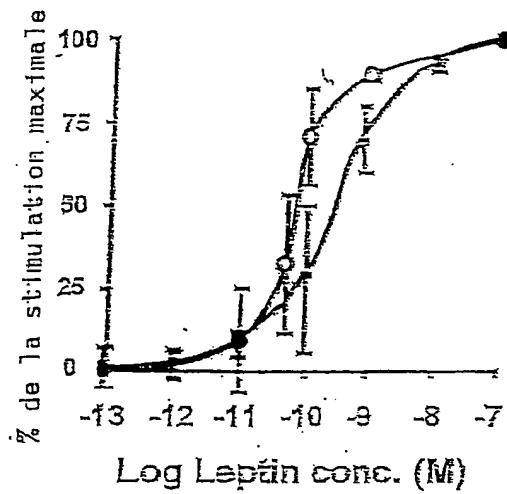
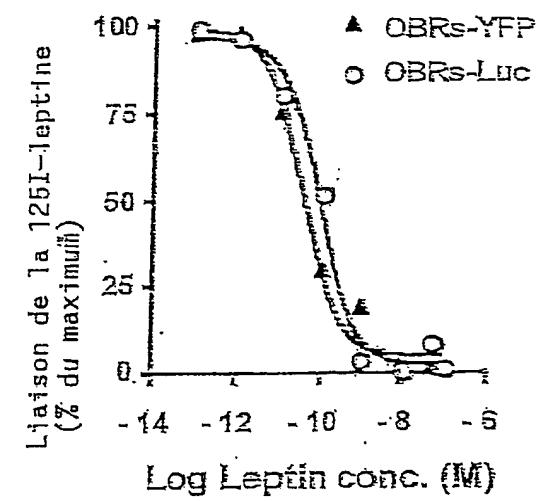


FIGURE 5D



X par stimulation par rapport au témoin

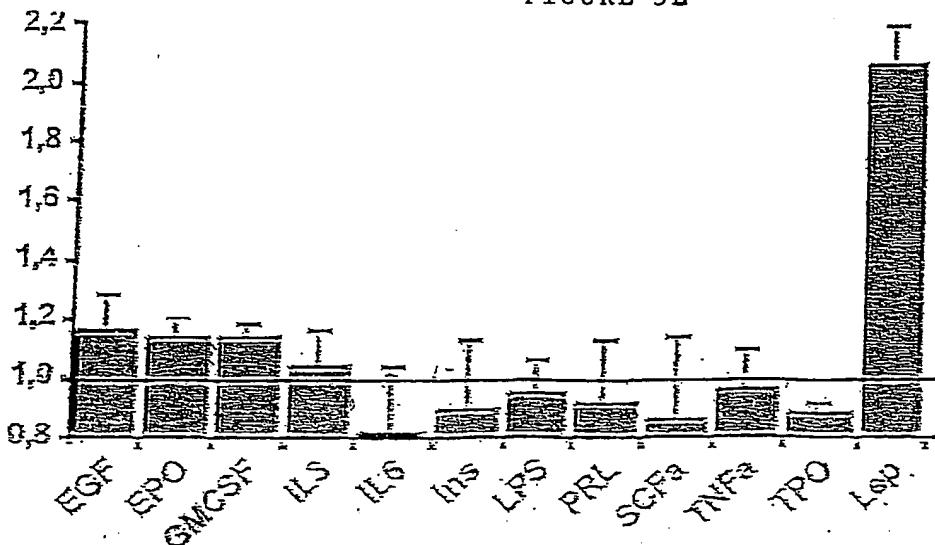
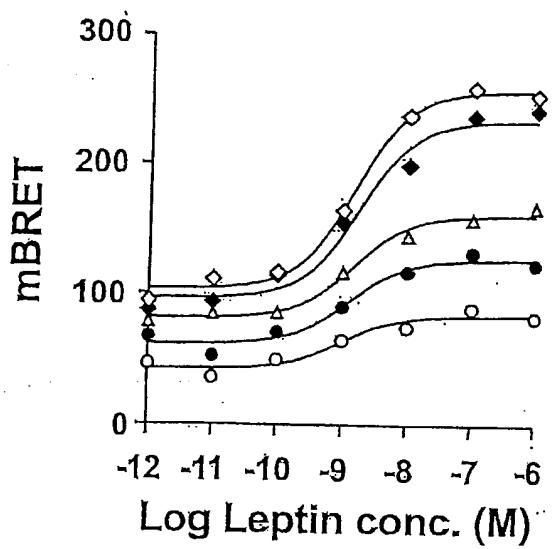


FIGURE 5E

6/6

Figure 6

LISTE DE SEQUENCES

<110> AVENTIS PHARMA S.A.
INSERM

<120> Procédé de criblage d'agonistes et d'antagonistes de la leptine

<130> RecepteurLeptineBRET

<140>
<141>

<160> 8

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 2691

<212> ADN

<213> Homo sapiens

2203

<221> CDS

<222> (1) (2691)

$\epsilon^{400} > 1$

atg att tgt caa aaa ttc tgt gtg gtt ttg tta cat tgg gaa ttt att 48
Met Ile Cys Gln Lys Phe Cys Val Val Leu Leu His Trp Glu Phe Ile
1 5 10 15

tat gtg ata act gcg ttt aac ttg tca tat cca att act cct tgg aga 96
 Tyr Val Ile Thr Ala Phe Asn Leu Ser Tyr Pro Ile Thr Pro Trp Arg
 20 25 30

ttt aag ttg tct tgc atg cca cca aat tca acc tat gac tac ttc ctt 144
Phe Lys Leu Ser Cys Met Pro Pro Asn Ser Thr Tyr Asp Tyr Phe Leu
35 40 45

ttg cct gct gga ctc tca aag aat act tca aat tcg aat gga cat tat 192
Leu Pro Ala Gly Leu Ser Lys Asn Thr Ser Asn Ser Asn Gly His Tyr
50 55 60

```

gag aca gct gtt gaa cct aag ttt aat tca agt ggt act cac ttt tct 240
Glu Thr Ala Val Glu Pro Lys Phe Asn Ser Ser Gly Thr His Phe Ser
   65           70           75           80

```

aac tta tcc aaa aca act ttc cac tgt tgc ttt cgg agt gag caa gat 288
 Asn Leu Ser Lys Thr Thr Phe His Cys Cys Phe Arg Ser Glu Gln Asp
 85 90 95

```

aga aac tgc tcc tta tgt gca gac aac att gaa gga aag aca ttt gtt 336
Arg Asn Cys Ser Leu Cys Ala Asp Asn Ile Glu Gly Lys Thr Phe Val
          100           105           110

```

tca aca gta aat tct tta gtt ttt caa caa ata gat gca aac tgg aac 384
 Ser Thr Val Asn Ser Leu Val Phe Gln Gln Ile Asp Ala Asn Trp Asn
 115 120 125

ata cag tgc tgg cta aaa gga gac tta aaa tta ttc atc tgt tat gtg 432
Ile Gln Cys Trp Leu Lys Gly Asp Leu Lys Leu Phe Ile Cys Tyr Val

130	135	140	
gag tca tta ttt aag aat cta ttc agg aat tat aac tat aag gtc cat 480			
Glu Ser Leu Phe Lys Asn Leu Phe Arg Asn Tyr Asn Tyr Lys Val His			
145	150	155	160
ctt tta tat gtt ctg cct gaa gtg tta gaa gat tca cct ctg gtt ccc 528			
Leu Leu Tyr Val Leu Pro Glu Val Leu Glu Asp Ser Pro Leu Val Pro			
165	170	175	
caa aaa ggc agt ttt cag atg gtt cac tgc aat tgc agt gtt cat gaa 576			
Gln Lys Gly Ser Phe Gln Met Val His Cys Asn Cys Ser Val His Glu			
180	185	190	
tgt tgt gaa tgt ctt gtg cct gtg cca aca gcc aaa ctc aac gac act 624			
Cys Cys Glu Cys Leu Val Pro Val Pro Thr Ala Lys Leu Asn Asp Thr			
195	200	205	
ctc ctt atg tgt ttg aaa atc aca tct ggt gga gta att ttc cag tca 672			
Leu Leu Met Cys Leu Lys Ile Thr Ser Gly Gly Val Ile Phe Gln Ser			
210	215	220	
cct cta atg tca gtt cag ccc ata aat atg gtg aag cct gat cca cca 720			
Pro Leu Met Ser Val Gln Pro Ile Asn Met Val Lys Pro Asp Pro Pro			
225	230	235	240
tta ggt ttg cat atg gaa atc aca gat gat ggt aat tta aag att tct 768			
Leu Gly Leu His Met Glu Ile Thr Asp Asp Gly Asn Leu Lys Ile Ser			
245	250	255	
tgg tcc agc cca cca ttg gta cca ttt cca ctt caa tat caa gtg aaa 816			
Trp Ser Ser Pro Pro Leu Val Pro Phe Pro Leu Gln Tyr Gln Val Lys			
260	265	270	
tat tca gag aat tct aca aca gtt atc aga gaa gct gac aag att gtc 864			
Tyr Ser Glu Asn Ser Thr Thr Val Ile Arg Glu Ala Asp Lys Ile Val			
275	280	285	
tca gct aca tcc ctg cta gta gac agt ata ctt cct ggg tct tcg tat 912			
Ser Ala Thr Ser Leu Leu Val Asp Ser Ile Leu Pro Gly Ser Ser Tyr			
290	295	300	
gag gtt cag gtg agg ggc aag aga ctg gat ggc cca gga atc tgg agt 960			
Glu Val Gln Val Arg Gly Lys Arg Leu Asp Gly Pro Gly Ile Trp Ser			
305	310	315	320
gac tgg agt act cct cgt gtc ttt acc aca caa gat gtc ata tac ttt 1008			
Asp Trp Ser Thr Pro Arg Val Phe Thr Thr Gln Asp Val Ile Tyr Phe			
325	330	335	
cca cct aaa att ctg aca agt gtt ggg tct aat gtt tct ttt cac tgc 1056			
Pro Pro Lys Ile Leu Thr Ser Val Gly Ser Asn Val Ser Phe His Cys			
340	345	350	
atc tat aag aag gaa aac aag att gtt ccc tca aaa gag att gtt tgg 1104			
Ile Tyr Lys Lys Glu Asn Lys Ile Val Pro Ser Lys Glu Ile Val Trp			
355	360	365	
tgg atg aat tta gct gag aaa att cct caa agc cag tat gat gtt gtg 1152			
Trp Met Asn Leu Ala Glu Lys Ile Pro Gln Ser Gln Tyr Asp Val Val			
370	375	380	

agt gat cat gtt agc aaa gtt act ttt ttc aat ctg aat gaa acc aaa Ser Asp His Val Ser Lys Val Thr Phe Phe Asn Leu Asn Glu Thr Lys 385 390 395 400	1200
cct cga gga aag ttt acc tat gat gca gtg tac tgc tgc aat gaa cat Pro Arg Gly Lys Phe Thr Tyr Asp Ala Val Tyr Cys Cys Asn Glu His 405 410 415	1248
gaa tgc cat cat cgc tat gct gaa tta tat gtg att gat gtc aat atc Glu Cys His His Arg Tyr Ala Glu Leu Tyr Val Ile Asp Val Asn Ile 420 425 430	1296
aat atc tca tgt gaa act gat ggg tac tta act aaa atg act tgc aga Asn Ile Ser Cys Glu Thr Asp Gly Tyr Leu Thr Lys Met Thr Cys Arg 435 440 445	1344
tgg tca acc agt aca atc cag tca ctt gcg gaa agc act ttg caa ttg Trp Ser Thr Ser Thr Ile Gln Ser Leu Ala Glu Ser Thr Leu Gln Leu 450 455 460	1392
agg tat cat agg agc agc ctt tac tgt tct gat att cca tct att cat Arg Tyr His Arg Ser Ser Leu Tyr Cys Ser Asp Ile Pro Ser Ile His 465 470 475 480	1440
ccc ata tct gag ccc aaa gat tgc tat ttg cag agt gat ggt ttt tat Pro Ile Ser Glu Pro Lys Asp Cys Tyr Leu Gln Ser Asp Gly Phe Tyr 485 490 495	1488
gaa tgc att ttc cag cca atc ttc cta tta tct ggc tac aca atg tgg Glu Cys Ile Phe Gln Pro Ile Phe Leu Leu Ser Gly Tyr Thr Met Trp 500 505 510	1536
att agg atc aat cac tct cta ggt tca ctt gac tct cca cca aca tgt Ile Arg Ile Asn His Ser Leu Gly Ser Leu Asp Ser Pro Pro Thr Cys 515 520 525	1584
gtc ctt cct gat tct gtg gtg aag cca ctg cct cca tcc agt gtg aaa Val Leu Pro Asp Ser Val Val Lys Pro Leu Pro Pro Ser Ser Val Lys 530 535 540	1632
gca gaa att act ata aac att gga tta ttg aaa ata tct tgg gaa aag Ala Glu Ile Thr Ile Asn Ile Gly Leu Leu Lys Ile Ser Trp Glu Lys 545 550 555 560	1680
cca gtc ttt cca gag aat aac cttcaa ttc cag att cgc tat ggt tta Pro Val Phe Pro Glu Asn Asn Leu Gln Phe Gln Ile Arg Tyr Gly Leu 565 570 575	1728
agt gga aaa gaa gta caa tgg aag atg tat gag gtt tat gat gca aaa Ser Gly Lys Glu Val Gln Trp Lys Met Tyr Glu Val Tyr Asp Ala Lys 580 585 590	1776
tca aaa tct gtc agt ctc cca gtt cca gac ttg tgt gca gtc tat gct Ser Lys Ser Val Ser Leu Pro Val Pro Asp Leu Cys Ala Val Tyr Ala 595 600 605	1824
gtt cag gtg cgc tgt aag agg cta gat gga ctg gga tat ttg agt aat Val Gln Val Arg Cys Lys Arg Leu Asp Gly Leu Gly Tyr Trp Ser Asn 610 615 620	1872

tgg agc aat cca gcc tac aca gtt gtc atg gat ata aaa gtt cct atg Trp Ser Asn Pro Ala Tyr Thr Val Val Met Asp Ile Lys Val Pro Met 625 630 635 640	1920
aga gga cct gaa ttt tgg aga ata att aat gga gat act atg aaa aag Arg Gly Pro Glu Phe Trp Arg Ile Ile Asn Gly Asp Thr Met Lys Lys 645 650 655	1968
gag aaa aat gtc act tta ctt tgg aag ccc ctg atg aaa aat gac tca Glu Lys Asn Val Thr Leu Leu Trp Lys Pro Leu Met Lys Asn Asp Ser 660 665 670	2016
ttg tgc agt gtt cag aga tat gtg ata aac cat cat act tcc tgc aat Leu Cys Ser Val Gln Arg Tyr Val Ile Asn His His Thr Ser Cys Asn 675 680 685	2064
gga aca tgg tca gaa gat gtg gga aat cac acg aaa ttc act ttc ctg Gly Thr Trp Ser Glu Asp Val Gly Asn His Thr Lys Phe Thr Phe Leu 690 695 700	2112
tgg aca gag caa gca cat act gtt acg gtt ctg gcc atc aat tca att Trp Thr Glu Gln Ala His Thr Val Thr Val Leu Ala Ile Asn Ser Ile 705 710 715 720	2160
ggg gct tct gtt gca aat ttt aat tta acc ttt tca tgg cct atg agc Gly Ala Ser Val Ala Asn Phe Asn Leu Thr Phe Ser Trp Pro Met Ser 725 730 735	2208
aaa gta aat atc gtg cag tca ctc agt gct tat cct tta aac agc agt Lys Val Asn Ile Val Gln Ser Leu Ser Ala Tyr Pro Leu Asn Ser Ser 740 745 750	2256
tgt gtg att gtt tcc tgg ata cta tca ccc agt gat tac aag cta atg Cys Val Ile Val Ser Trp Ile Leu Ser Pro Ser Asp Tyr Lys Leu Met 755 760 765	2304
tat ttt att att gag tgg aaa aat ctt aat gaa gat ggt gaa ata aaa Tyr Phe Ile Ile Glu Trp Lys Asn Leu Asn Glu Asp Gly Glu Ile Lys 770 775 780	2352
tgg ctt aga atc tct tca tct gtt aag aag tat tat atc cat gat cat Trp Leu Arg Ile Ser Ser Val Lys Lys Tyr Tyr Ile His Asp His 785 790 795 800	2400
ttt atc ccc att gag aag tac cag ttc agt ctt tac cca ata ttt atg Phe Ile Pro Ile Glu Lys Tyr Gln Phe Ser Leu Tyr Pro Ile Phe Met 805 810 815	2448
gaa gga gtg gga aaa cca aag ata att aat agt ttc actcaa gat gat Glu Gly Val Gly Lys Pro Lys Ile Ile Asn Ser Phe Thr Gln Asp Asp 820 825 830	2496
att gaa aaa cac cag agt gat gca ggt tta tat gta att gtg cca gta Ile Glu Lys His Gln Ser Asp Ala Gly Leu Tyr Val Ile Val Pro Val 835 840 845	2544
att att tcc tct tcc atc tta ttg ctt gga aca tta tta ata tca cac Ile Ile Ser Ser Ile Leu Leu Leu Gly Thr Leu Leu Ile Ser His 850 855 860	2592
caa aga atg aaa aag cta ttt tgg gaa gat gtt ccg aac ccc aag aat	2640

5/33

Gln	Arg	Met	Lys	Lys	Leu	Phe	Trp	Glu	Asp	Val	Pro	Asn	Pro	Lys	Asn	
865					870					875				880		
tgt	tcc	tgg	gca	caa	gga	ctt	aat	ttt	cag	aag	aga	acg	gac	att	ctt	2688
Cys	Ser	Trp	Ala	Gln	Gly	Leu	Asn	Phe	Gln	Lys	Arg	Thr	Asp	Ile	Leu	
														885	890	895
tga																2691

<210> 2
<211> 896
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 2																
Met	Ile	Cys	Gln	Lys	Phe	Cys	Val	Val	Leu	Leu	His	Trp	Glu	Phe	Ile	
1					5				10					15		

Tyr	Val	Ile	Thr	Ala	Phe	Asn	Leu	Ser	Tyr	Pro	Ile	Thr	Pro	Trp	Arg
20							25						30		

Phe	Lys	Leu	Ser	Cys	Met	Pro	Pro	Asn	Ser	Thr	Tyr	Asp	Tyr	Phe	Leu
35						40						45			

Leu	Pro	Ala	Gly	Leu	Ser	Lys	Asn	Thr	Ser	Asn	Ser	Asn	Gly	His	Tyr
50						55						60			

Glu	Thr	Ala	Val	Glu	Pro	Lys	Phe	Asn	Ser	Ser	Gly	Thr	His	Phe	Ser
65						70					75		80		

Asn	Leu	Ser	Lys	Thr	Thr	Phe	His	Cys	Cys	Phe	Arg	Ser	Glu	Gln	Asp
85						90					95				

Arg	Asn	Cys	Ser	Leu	Cys	Ala	Asp	Asn	Ile	Glu	Gly	Lys	Thr	Phe	Val
100							105			110					

Ser	Thr	Val	Asn	Ser	Leu	Val	Phe	Gln	Gln	Ile	Asp	Ala	Asn	Trp	Asn
115						120				125					

Ile	Gln	Cys	Trp	Leu	Lys	Gly	Asp	Leu	Lys	Leu	Phe	Ile	Cys	Tyr	Val
130						135				140					

Glu	Ser	Leu	Phe	Lys	Asn	Leu	Phe	Arg	Asn	Tyr	Asn	Tyr	Lys	Val	His
145					150				155		160				

Leu	Leu	Tyr	Val	Leu	Pro	Glu	Val	Leu	Glu	Asp	Ser	Pro	Leu	Val	Pro
165						170					175				

Gln	Lys	Gly	Ser	Phe	Gln	Met	Val	His	Cys	Asn	Cys	Ser	Val	His	Glu
180						185					190				

Cys	Cys	Glu	Cys	Leu	Val	Pro	Val	Pro	Thr	Ala	Lys	Leu	Asn	Asp	Thr
195						200					205				

Leu	Leu	Met	Cys	Leu	Lys	Ile	Thr	Ser	Gly	Gly	Val	Ile	Phe	Gln	Ser
210						215					220				

Pro	Leu	Met	Ser	Val	Gln	Pro	Ile	Asn	Met	Val	Lys	Pro	Asp	Pro	Pro
225						230				235		240			

Leu Gly Leu His Met Glu Ile Thr Asp Asp Gly Asn Leu Lys Ile Ser
245 250 255

Trp Ser Ser Pro Pro Leu Val Pro Phe Pro Leu Gln Tyr Gln Val Lys
260 265 270

Tyr Ser Glu Asn Ser Thr Thr Val Ile Arg Glu Ala Asp Lys Ile Val
275 280 285

Ser Ala Thr Ser Leu Leu Val Asp Ser Ile Leu Pro Gly Ser Ser Tyr
290 295 300

Glu Val Gln Val Arg Gly Lys Arg Leu Asp Gly Pro Gly Ile Trp Ser
305 310 315 320

Asp Trp Ser Thr Pro Arg Val Phe Thr Thr Gln Asp Val Ile Tyr Phe
325 330 335

Pro Pro Lys Ile Leu Thr Ser Val Gly Ser Asn Val Ser Phe His Cys
340 345 350

Ile Tyr Lys Lys Glu Asn Lys Ile Val Pro Ser Lys Glu Ile Val Trp
355 360 365

Trp Met Asn Leu Ala Glu Lys Ile Pro Gln Ser Gln Tyr Asp Val Val
370 375 380

Ser Asp His Val Ser Lys Val Thr Phe Phe Asn Leu Asn Glu Thr Lys
385 390 395 400

Pro Arg Gly Lys Phe Thr Tyr Asp Ala Val Tyr Cys Cys Asn Glu His
405 410 415

Glu Cys His His Arg Tyr Ala Glu Leu Tyr Val Ile Asp Val Asn Ile
420 425 430

Asn Ile Ser Cys Glu Thr Asp Gly Tyr Leu Thr Lys Met Thr Cys Arg
435 440 445

Trp Ser Thr Ser Thr Ile Gln Ser Leu Ala Glu Ser Thr Leu Gln Leu
450 455 460

Arg Tyr His Arg Ser Ser Leu Tyr Cys Ser Asp Ile Pro Ser Ile His
465 470 475 480

Pro Ile Ser Glu Pro Lys Asp Cys Tyr Leu Gln Ser Asp Gly Phe Tyr
485 490 495

Glu Cys Ile Phe Gln Pro Ile Phe Leu Leu Ser Gly Tyr Thr Met Trp
500 505 510

Ile Arg Ile Asn His Ser Leu Gly Ser Leu Asp Ser Pro Pro Thr Cys
515 520 525

Val Leu Pro Asp Ser Val Val Lys Pro Leu Pro Pro Ser Ser Val Lys
530 535 540

Ala Glu Ile Thr Ile Asn Ile Gly Leu Leu Lys Ile Ser Trp Glu Lys
545 550 555 560

Pro Val Phe Pro Glu Asn Asn Leu Gln Phe Gln Ile Arg Tyr Gly Leu
565 570 575

Ser Gly Lys Glu Val Gln Trp Lys Met Tyr Glu Val Tyr Asp Ala Lys
580 585 590

Ser Lys Ser Val Ser Leu Pro Val Pro Asp Leu Cys Ala Val Tyr Ala
595 600 605

Val Gln Val Arg Cys Lys Arg Leu Asp Gly Leu Gly Tyr Trp Ser Asn
610 615 620

Trp Ser Asn Pro Ala Tyr Thr Val Val Met Asp Ile Lys Val Pro Met
625 630 635 640

Arg Gly Pro Glu Phe Trp Arg Ile Ile Asn Gly Asp Thr Met Lys Lys
645 650 655

Glu Lys Asn Val Thr Leu Leu Trp Lys Pro Leu Met Lys Asn Asp Ser
660 665 670

Leu Cys Ser Val Gln Arg Tyr Val Ile Asn His His Thr Ser Cys Asn
675 680 685

Gly Thr Trp Ser Glu Asp Val Gly Asn His Thr Lys Phe Thr Phe Leu
690 695 700

Trp Thr Glu Gln Ala His Thr Val Thr Val Leu Ala Ile Asn Ser Ile
705 710 715 720

Gly Ala Ser Val Ala Asn Phe Asn Leu Thr Phe Ser Trp Pro Met Ser
725 730 735

Lys Val Asn Ile Val Gln Ser Leu Ser Ala Tyr Pro Leu Asn Ser Ser
740 745 750

Cys Val Ile Val Ser Trp Ile Leu Ser Pro Ser Asp Tyr Lys Leu Met
755 760 765

Tyr Phe Ile Ile Glu Trp Lys Asn Leu Asn Glu Asp Gly Glu Ile Lys
770 775 780

Trp Leu Arg Ile Ser Ser Val Lys Lys Tyr Tyr Ile His Asp His
785 790 795 800

Phe Ile Pro Ile Glu Lys Tyr Gln Phe Ser Leu Tyr Pro Ile Phe Met
805 810 815

Glu Gly Val Gly Lys Pro Lys Ile Ile Asn Ser Phe Thr Gln Asp Asp
820 825 830

Ile Glu Lys His Gln Ser Asp Ala Gly Leu Tyr Val Ile Val Pro Val
835 840 845

Ile Ile Ser Ser Ser Ile Leu Leu Leu Gly Thr Leu Leu Ile Ser His
850 855 860

Gln Arg Met Lys Lys Leu Phe Trp Glu Asp Val Pro Asn Pro Lys Asn
865 870 875 880

Cys Ser Trp Ala Gln Gly Leu Asn Phe Gln Lys Arg Thr Asp Ile Leu

885

890

895

<210> 3
<211> 2751
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<221> CDS
<222> (1) . . (2757)

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:Protéine
de fusion comprenant une partie d'OBRS

<400> 3
atg gtt ctt gcc agc tct acc acc agc atc cac acc atg ctg ctc ctg 48
Met Val Leu Ala Ser Ser Thr Thr Ser Ile His Thr Met Leu Leu Leu
1 5 10 15

ctc ctg atg ctc ttc cac ctg gga ctc caa gct tca atc tcg gcg cg
 Leu Leu Met Leu Phe His Leu Gly Leu Gln Ala Ser Ile Ser Ala Arg
 20 25 30

cag gag cag aag ctt atc tcg gag gag gac ctg acg cgt tat cca att 144
Gln Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Thr Arg Tyr Pro Ile
35 40 45

act cct tgg aga ttt aag ttg tct tgc atg cca cca aat tca acc tat 192
Thr Pro Trp Arg Phe Lys Leu Ser Cys Met Pro Pro Asn Ser Thr Tyr
50 55 60

```

gac tac ttc ctt ttg cct gct gga ctc tca aag aat act tca aat tcg 240
Asp Tyr Phe Leu Leu Pro Ala Gly Leu Ser Lys Asn Thr Ser Asn Ser
   65           70           75           80

```

aat gga cat tat gag aca gct gtt gaa cct aag ttt aat tca agt ggt 288
Asn Gly His Tyr Glu Thr Ala Val Glu Pro Lys Phe Asn Ser Ser Gly
85 90 95

act cac ttt tct aac tta tcc aaa aca act ttc cac tgt tgc ttt cgg 336
 Thr His Phe Ser Asn Leu Ser Lys Thr Thr Phe His Cys Cys Phe Arg
 100 105 110

agt gag caa gat aga aac tgc tcc tta tgt gca gac aac att gaa gga 384
 Ser Glu Gln Asp Arg Asn Cys Ser Leu Cys Ala Asp Asn Ile Glu Gly
 115 120 125

```

acg aca ttt gtt tca aca gta aat tct tta gtt ttt caa caa ata gat 432
Thr Thr Phe Val Ser Thr Val Asn Ser Leu Val Phe Gln Gln Ile Asp
      130          135          140

```

gca aac tgg aac ata cag tgc tgg cta aaa gga gac tta aaa tta ttc 480
 Ala Asn Trp Asn Ile Gln Cys Trp Leu Lys Gly Asp Leu Lys Leu Phe
 145 150 155 160

atc tgt tat gtg gag tca tta ttt aag aat cta ttc agg aat tat aac 528
 Ile Cys Tyr Val Glu Ser Leu Phe Lys Asn Leu Phe Arg Asn Tyr Asn
 165 170 175

tat aag gtc cat ctt tta tat gtt ctg cct gaa gtg tta gaa gat tca Tyr Lys Val His Leu Leu Tyr Val Leu Pro Glu Val Leu Glu Asp Ser 180 185 190	576
cct ctg gtt ccc caa aaa ggc agt ttt cag atg gtt cac tgc aat tgc Pro Leu Val Pro Gln Lys Gly Ser Phe Gln Met Val His Cys Asn Cys 195 200 205	624
agt gtt cat gaa tgt tgt gaa tgt ctt gtg cct gtg cca aca gcc aaa Ser Val His Glu Cys Cys Glu Cys Leu Val Pro Val Pro Thr Ala Lys 210 215 220	672
ctc aac gac act ctc ctt atg tgt ttg aaa atc aca tct ggt gga gta Leu Asn Asp Thr Leu Leu Met Cys Leu Lys Ile Thr Ser Gly Gly Val 225 230 235 240	720
att ttc cgg tca cct cta atg tca gtt cag ccc ata aat atg gtg aag Ile Phe Arg Ser Pro Leu Met Ser Val Gln Pro Ile Asn Met Val Lys 245 250 255	768
cct gat cca cca tta ggt ttg cat atg gaa atc aca gat gat ggt aat Pro Asp Pro Pro Leu Gly Leu His Met Glu Ile Thr Asp Asp Gly Asn 260 265 270	816
tta aag att tct tgg tcc agc cca cca ttg gta cca ttt cca ctt caa Leu Lys Ile Ser Trp Ser Ser Pro Pro Leu Val Pro Phe Pro Leu Gln 275 280 285	864
tat caa gtg aaa tat tca gag aat tct aca aca gtt atc aga gaa gct Tyr Gln Val Lys Tyr Ser Glu Asn Ser Thr Thr Val Ile Arg Glu Ala 290 295 300	912
gac aag att gtc tca gct aca tcc ctg cta gta gac agt ata ctt cct Asp Lys Ile Val Ser Ala Thr Ser Leu Leu Val Asp Ser Ile Leu Pro 305 310 315 320	960
ggg tct tcg tat gag gtt cag gtg agg ggc aag aga ctg gat ggc cca Gly Ser Ser Tyr Glu Val Gln Val Arg Gly Lys Arg Leu Asp Gly Pro 325 330 335	1008
gga atc tgg agt gac tgg agt act cct cgt gtc ttt acc aca caa gat Gly Ile Trp Ser Asp Trp Ser Thr Pro Arg Val Phe Thr Thr Gln Asp 340 345 350	1056
gtc ata tac ttt cca cct aaa att ctg aca agt gtt ggg tct aat gtt Val Ile Tyr Phe Pro Pro Lys Ile Leu Thr Ser Val Gly Ser Asn Val 355 360 365	1104
tct ttt cac tgc atc tat aag aag gaa aac aag att gtt ccc tca aaa Ser Phe His Cys Ile Tyr Lys Lys Glu Asn Lys Ile Val Pro Ser Lys 370 375 380	1152
gag att gtt tgg tgg atg aat tta gct gag aaa att cct caa agc cag Glu Ile Val Trp Trp Met Asn Leu Ala Glu Lys Ile Pro Gln Ser Gln 385 390 395 400	1200
tat gat gtt gtg agt gat cat gtt agc aaa gtt act ttt ttc aat ctg Tyr Asp Val Val Ser Asp His Val Ser Lys Val Thr Phe Phe Asn Leu 405 410 415	1248

10/33

aat gaa acc aaa cct cga gga aag ttt acc tat gat gca gtg tac tgc Asn Glu Thr Lys Pro Arg Gly Lys Phe Thr Tyr Asp Ala Val Tyr Cys 420 425 430	1296
tgc aat gaa cat gaa tgc cat cat cgc tat gct gaa tta tat gtg att Cys Asn Glu His Glu Cys His Arg Tyr Ala Glu Leu Tyr Val Ile 435 440 445	1344
gat gtc aat atc aat atc tca tgt gaa act gat ggg tac tta act aaa Asp Val Asn Ile Asn Ile Ser Cys Glu Thr Asp Gly Tyr Leu Thr Lys 450 455 460	1392
atg act tgc aga tgg tca acc agt aca atc cag tca ctt gcg gaa agc Met Thr Cys Arg Trp Ser Thr Ser Thr Ile Gln Ser Leu Ala Glu Ser 465 470 475 480	1440
act ttg caa ttg agg tat cat agg agc agc ctt tac tgt tct gat att Thr Leu Gln Leu Arg Tyr His Arg Ser Ser Leu Tyr Cys Ser Asp Ile 485 490 495	1488
cca tct att cat ccc ata tct gag ccc aaa gat tgc tat ttg cag agt Pro Ser Ile His Pro Ile Ser Glu Pro Lys Asp Cys Tyr Leu Gln Ser 500 505 510	1536
gat ggt ttt tat gaa tgc att ttc cag cca atc ttc cta tta tct ggc Asp Gly Phe Tyr Glu Cys Ile Phe Gln Pro Ile Phe Leu Leu Ser Gly 515 520 525	1584
tac aca atg tgg att agg atc aat cac tct cta ggt tca ctt gac tct Tyr Thr Met Trp Ile Arg Ile Asn His Ser Leu Gly Ser Leu Asp Ser 530 535 540	1632
cca cca aca tgt gtc ctt cct gat tct gtg gtg aag cca ctg cct cca Pro Pro Thr Cys Val Leu Pro Asp Ser Val Val Lys Pro Leu Pro Pro 545 550 555 560	1680
tcc agt gtg aaa gca gaa att act ata aac att gga tta ttg aaa ata Ser Ser Val Lys Ala Glu Ile Thr Ile Asn Ile Gly Leu Leu Lys Ile 565 570 575	1728
tct tgg gaa aag cca gtc ttt cca gag aat aac cttcaa ttc cag att Ser Trp Glu Lys Pro Val Phe Pro Glu Asn Asn Leu Gln Phe Gln Ile 580 585 590	1776
cgc tat ggt tta agt gga aaa gaa gta caa tgg aag atg tat gag gtt Arg Tyr Gly Leu Ser Gly Lys Glu Val Gln Trp Lys Met Tyr Glu Val 595 600 605	1824
tat gat gca aaa tca aaa tct gtc agt ctc cca gtt cca gac ttg tgt Tyr Asp Ala Lys Ser Lys Ser Val Ser Leu Pro Val Pro Asp Leu Cys 610 615 620	1872
gca gtc tat gct gtt cag gtg cgc tgt aag agg cta gat gga ctg gga Ala Val Tyr Ala Val Gln Val Arg Cys Lys Arg Leu Asp Gly Leu Gly 625 630 635 640	1920
tat tgg agt aat tgg agc aat cca gcc tac aca gtt gtc atg gat ata Tyr Trp Ser Asn Trp Ser Asn Pro Ala Tyr Thr Val Val Met Asp Ile 645 650 655	1968
aaa gtt cct atg aga gga cct gaa ttt tgg aga ata att aat gga gat	2016

11/33

Lys Val Pro Met Arg Gly Pro Glu Phe Trp Arg Ile Ile Asn Gly Asp			
660	665	670	
act atg aaa aag gag aaa aat gtc act tta ctt tgg aag ccc ctg atg			2064
Thr Met Lys Lys Glu Lys Asn Val Thr Leu Leu Trp Lys Pro Leu Met			
675	680	685	
aaa aat gac tca ttg tgc agt gtt cag aga tat gtg ata aac cat cat			2112
Lys Asn Asp Ser Leu Cys Ser Val Gln Arg Tyr Val Ile Asn His His			
690	695	700	
act tcc tgc aat gga aca tgg tca gaa gat gtg gga aat cac acg aaa			2160
Thr Ser Cys Asn Gly Thr Trp Ser Glu Asp Val Gly Asn His Thr Lys			
705	710	715	720
ttc act ttc ctg tgg aca gag caa gca cat act gtt acg gtt ctg gcc			2208
Phe Thr Phe Leu Trp Thr Glu Gln Ala His Thr Val Thr Val Leu Ala			
725	730	735	
atc aat tca att ggt gct tct gtt gca aat ttt aat tta acc ttt tca			2256
Ile Asn Ser Ile Gly Ala Ser Val Ala Asn Phe Asn Leu Thr Phe Ser			
740	745	750	
tgg cct atg agc aaa gta aat atc gtg cag tca ctc agt gct tat cct			2304
Trp Pro Met Ser Lys Val Asn Ile Val Gln Ser Leu Ser Ala Tyr Pro			
755	760	765	
tta aac agc agt tgt gtg att gtt tcc tgg ata cta tca ccc agt gat			2352
Leu Asn Ser Ser Cys Val Ile Val Ser Trp Ile Leu Ser Pro Ser Asp			
770	775	780	
tac aag cta atg tat ttt att att gag tgg aaa aat ctt aat gaa gat			2400
Tyr Lys Leu Met Tyr Phe Ile Ile Glu Trp Lys Asn Leu Asn Glu Asp			
785	790	795	800
ggt gaa ata aaa tgg ctt aga atc tct tca tct gtt aag aag tat tat			2448
Gly Glu Ile Lys Trp Leu Arg Ile Ser Ser Val Lys Lys Tyr Tyr			
805	810	815	
atc cat gat cat ttt atc ccc att gag aag tac cag ttc agt ctt tac			2496
Ile His Asp His Phe Ile Pro Ile Glu Lys Tyr Gln Phe Ser Leu Tyr			
820	825	830	
cca ata ttt atg gaa gga gtg gga aaa cca aag ata att aat agt ttc			2544
Pro Ile Phe Met Glu Gly Val Gly Lys Pro Lys Ile Ile Asn Ser Phe			
835	840	845	
actcaa gat gat att gaa aaa cac cag agt gat gca ggt tta tat gta			2592
Thr Gln Asp Asp Ile Glu Lys His Gln Ser Asp Ala Gly Leu Tyr Val			
850	855	860	
att gtg cca gta att att tcc tct tcc atc tta ttg ctt gga aca tta			2640
Ile Val Pro Val Ile Ile Ser Ser Ile Leu Leu Leu Gly Thr Leu			
865	870	875	880
tta ata tca cac caa aga atg aaa aag cta ttt tgg gaa gat gtt ccg			2688
Leu Ile Ser His Gln Arg Met Lys Lys Leu Phe Trp Glu Asp Val Pro			
885	890	895	
aac ccc aag aat tgt tcc tgg gca caa gga ctt aat ttt cag aag aga			2736
Asn Pro Lys Asn Cys Ser Trp Ala Gln Gly Leu Asn Phe Gln Lys Arg			

900

905

910

acg gac att ctt tga
 Thr Asp Ile Leu
 915

2751

<210> 4
 <211> 916
 <212> PRT
 <213> Séquence artificielle
 <223> Description de la séquence artificielle: Protéine
 de fusion comprenant une partie d'OBRs

<400> 4
 Met Val Leu Ala Ser Ser Thr Thr Ser Ile His Thr Met Leu Leu Leu
 1 5 10 15

Leu Leu Met Leu Phe His Leu Gly Leu Gln Ala Ser Ile Ser Ala Arg
 20 25 30

Gln Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Thr Arg Tyr Pro Ile
 35 40 45

Thr Pro Trp Arg Phe Lys Leu Ser Cys Met Pro Pro Asn Ser Thr Tyr
 50 55 60

Asp Tyr Phe Leu Leu Pro Ala Gly Leu Ser Lys Asn Thr Ser Asn Ser
 65 70 75 80

Asn Gly His Tyr Glu Thr Ala Val Glu Pro Lys Phe Asn Ser Ser Gly
 85 90 95

Thr His Phe Ser Asn Leu Ser Lys Thr Thr Phe His Cys Cys Phe Arg
 100 105 110

Ser Glu Gln Asp Arg Asn Cys Ser Leu Cys Ala Asp Asn Ile Glu Gly
 115 120 125

Thr Thr Phe Val Ser Thr Val Asn Ser Leu Val Phe Gln Gln Ile Asp
 130 135 140

Ala Asn Trp Asn Ile Gln Cys Trp Leu Lys Gly Asp Leu Lys Leu Phe
 145 150 155 160

Ile Cys Tyr Val Glu Ser Leu Phe Lys Asn Leu Phe Arg Asn Tyr Asn
 165 170 175

Tyr Lys Val His Leu Leu Tyr Val Leu Pro Glu Val Leu Glu Asp Ser
 180 185 190

Pro Leu Val Pro Gln Lys Gly Ser Phe Gln Met Val His Cys Asn Cys
 195 200 205

Ser Val His Glu Cys Cys Glu Cys Leu Val Pro Val Pro Thr Ala Lys
 210 215 220

Leu Asn Asp Thr Leu Leu Met Cys Leu Lys Ile Thr Ser Gly Gly Val
 225 230 235 240

Ile Phe Arg Ser Pro Leu Met Ser Val Gln Pro Ile Asn Met Val Lys

13/33

245 250 255

Pro Asp Pro Pro Leu Gly Leu His Met Glu Ile Thr Asp Asp Gly Asn
260 265 270Leu Lys Ile Ser Trp Ser Ser Pro Pro Leu Val Pro Phe Pro Leu Gln
275 280 285Tyr Gln Val Lys Tyr Ser Glu Asn Ser Thr Thr Val Ile Arg Glu Ala
290 295 300Asp Lys Ile Val Ser Ala Thr Ser Leu Leu Val Asp Ser Ile Leu Pro
305 310 315 320Gly Ser Ser Tyr Glu Val Gln Val Arg Gly Lys Arg Leu Asp Gly Pro
325 330 335Gly Ile Trp Ser Asp Trp Ser Thr Pro Arg Val Phe Thr Thr Gln Asp
340 345 350Val Ile Tyr Phe Pro Pro Lys Ile Leu Thr Ser Val Gly Ser Asn Val
355 360 365Ser Phe His Cys Ile Tyr Lys Lys Glu Asn Lys Ile Val Pro Ser Lys
370 375 380Glu Ile Val Trp Trp Met Asn Leu Ala Glu Lys Ile Pro Gln Ser Gln
385 390 395 400Tyr Asp Val Val Ser Asp His Val Ser Lys Val Thr Phe Phe Asn Leu
405 410 415Asn Glu Thr Lys Pro Arg Gly Lys Phe Thr Tyr Asp Ala Val Tyr Cys
420 425 430Cys Asn Glu His Glu Cys His His Arg Tyr Ala Glu Leu Tyr Val Ile
435 440 445Asp Val Asn Ile Asn Ile Ser Cys Glu Thr Asp Gly Tyr Leu Thr Lys
450 455 460Met Thr Cys Arg Trp Ser Thr Ser Thr Ile Gln Ser Leu Ala Glu Ser
465 470 475 480Thr Leu Gln Leu Arg Tyr His Arg Ser Ser Leu Tyr Cys Ser Asp Ile
485 490 495Pro Ser Ile His Pro Ile Ser Glu Pro Lys Asp Cys Tyr Leu Gln Ser
500 505 510Asp Gly Phe Tyr Glu Cys Ile Phe Gln Pro Ile Phe Leu Leu Ser Gly
515 520 525Tyr Thr Met Trp Ile Arg Ile Asn His Ser Leu Gly Ser Leu Asp Ser
530 535 540Pro Pro Thr Cys Val Leu Pro Asp Ser Val Val Lys Pro Leu Pro Pro
545 550 555 560Ser Ser Val Lys Ala Glu Ile Thr Ile Asn Ile Gly Leu Leu Lys Ile
565 570 575

Ser Trp Glu Lys Pro Val Phe Pro Glu Asn Asn Leu Gln Phe Gln Ile
580 585 590

Arg Tyr Gly Leu Ser Gly Lys Glu Val Gln Trp Lys Met Tyr Glu Val
595 600 605

Tyr Asp Ala Lys Ser Lys Ser Val Ser Leu Pro Val Pro Asp Leu Cys
610 615 620

Ala Val Tyr Ala Val Gln Val Arg Cys Lys Arg Leu Asp Gly Leu Gly
625 630 635 640

Tyr Trp Ser Asn Trp Ser Asn Pro Ala Tyr Thr Val Val Met Asp Ile
645 650 655

Lys Val Pro Met Arg Gly Pro Glu Phe Trp Arg Ile Ile Asn Gly Asp
660 665 670

Thr Met Lys Lys Glu Lys Asn Val Thr Leu Leu Trp Lys Pro Leu Met
675 680 685

Lys Asn Asp Ser Leu Cys Ser Val Gln Arg Tyr Val Ile Asn His His
690 695 700

Thr Ser Cys Asn Gly Thr Trp Ser Glu Asp Val Gly Asn His Thr Lys
705 710 715 720

Phe Thr Phe Leu Trp Thr Glu Gln Ala His Thr Val Thr Val Leu Ala
725 730 735

Ile Asn Ser Ile Gly Ala Ser Val Ala Asn Phe Asn Leu Thr Phe Ser
740 745 750

Trp Pro Met Ser Lys Val Asn Ile Val Gln Ser Leu Ser Ala Tyr Pro
755 760 765

Leu Asn Ser Ser Cys Val Ile Val Ser Trp Ile Leu Ser Pro Ser Asp
770 775 780

Tyr Lys Leu Met Tyr Phe Ile Ile Glu Trp Lys Asn Leu Asn Glu Asp
785 790 795 800

Gly Glu Ile Lys Trp Leu Arg Ile Ser Ser Ser Val Lys Lys Tyr Tyr
805 810 815

Ile His Asp His Phe Ile Pro Ile Glu Lys Tyr Gln Phe Ser Leu Tyr
820 825 830

Pro Ile Phe Met Glu Gly Val Gly Lys Pro Lys Ile Ile Asn Ser Phe
835 840 845

Thr Gln Asp Asp Ile Glu Lys His Gln Ser Asp Ala Gly Leu Tyr Val
850 855 860

Ile Val Pro Val Ile Ile Ser Ser Ser Ile Leu Leu Leu Gly Thr Leu
865 870 875 880

Leu Ile Ser His Gln Arg Met Lys Lys Leu Phe Trp Glu Asp Val Pro
885 890 895

Asn Pro Lys Asn Cys Ser Trp Ala Gln Gly Leu Asn Phe Gln Lys Arg
900 905 910

Thr Asp Ile Leu
915

<210> 5
<211> 3705
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence
artificielle:fusionOBRluc

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(3705)

<400> 5
atg gtt ctt gcc agc tct acc acc agc atc cac acc atg ctg ctc ctg 48
Met Val Leu Ala Ser Ser Thr Thr Ser Ile His Thr Met Leu Leu Leu
1 5 10 15

ctc ctg atg ctc ttc cac ctg gga ctc caa gct tca atc tcg gcg cg 96
 Leu Leu Met Leu Phe His Leu Gly Leu Gln Ala Ser Ile Ser Ala Arg
 20 25 30

cag gag cag aag ctt atc tcg gag gag gac ctg acg cgt tat cca att 144
 Gln Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Thr Arg Tyr Pro Ile
 35 40 45

gac tac ttc ctt ttg cct gct gga ctc tca aag aat act tca aat tcg	240		
Asp Tyr Phe Leu Leu Pro Ala Gly Leu Ser Lys Asn Thr Ser Asn Ser			
65	70	75	80

```

aat gga cat tat gag aca gct gtt gaa cct aag ttt aat tca agt ggt 288
Asn Gly His Tyr Glu Thr Ala Val Glu Pro Lys Phe Asn Ser Ser Gly
85           90           95

```

act cac ttt tct aac tta tcc aaa aca act ttc cac tgt tgc ttt cgg 336
 Thr His Phe Ser Asn Leu Ser Lys Thr Thr Phe His Cys Cys Phe Arg
 100 105 110

agt gag caa gat aga aac tgc tcc tta tgt gca gac aac att gaa gga 384
 Ser Glu Gln Asp Arg Asn Cys Ser Leu Cys Ala Asp Asn Ile Glu Gly
 115 120 125

```

acg aca ttt gtt tca aca gta aat tct tta gtt ttt caa caa ata gat 432
Thr Thr Val Ser Thr Val Asn Ser Leu Val Phe Gln Gln Ile Asp
130          135          140

```

gca aac tgg aac ata cag tgc tgg cta aaa gga gac tta aaa tta ttc 480
 Ala Asn Trp Asn Ile Gln Cys Trp Leu Lys Gly Asp Leu Lys Leu Phe
 145 150 155 160

atc tgt tat gtg gag tca tta ttt aag aat cta ttc agg aat tat aac Ile Cys Tyr Val Glu Ser Leu Phe Lys Asn Leu Phe Arg Asn Tyr Asn 165 170 175	528
tat aag gtc cat ctt tta tat gtt ctg cct gaa gtg tta gaa gat tca Tyr Lys Val His Leu Leu Tyr Val Leu Pro Glu Val Leu Glu Asp Ser 180 185 190	576
cct ctg gtt ccc caa aaa ggc agt ttt cag atg gtt cac tgc aat tgc Pro Leu Val Pro Gln Lys Gly Ser Phe Gln Met Val His Cys Asn Cys 195 200 205	624
agt gtt cat gaa tgt tgt gaa tgt ctt gtg cct gtg cca aca gcc aaa Ser Val His Glu Cys Cys Glu Cys Leu Val Pro Val Pro Thr Ala Lys 210 215 220	672
ctc aac gac act ctc ctt atg tgt ttg aaa atc aca tct ggt gga gta Leu Asn Asp Thr Leu Leu Met Cys Leu Lys Ile Thr Ser Gly Gly Val 225 230 235 240	720
att ttc cgg tca cct cta atg tca gtt cag ccc ata aat atg gtg aag Ile Phe Arg Ser Pro Leu Met Ser Val Gln Pro Ile Asn Met Val Lys 245 250 255	768
cct gat cca cca tta ggt ttg cat atg gaa atc aca gat gat ggt aat Pro Asp Pro Pro Leu Gly Leu His Met Glu Ile Thr Asp Asp Gly Asn 260 265 270	816
tta aag att tct tgg tcc agc cca cca ttg gta cca ttt cca ctt caa Leu Lys Ile Ser Trp Ser Ser Pro Pro Leu Val Pro Phe Pro Leu Gln 275 280 285	864
tat caa gtg aaa tat tca gag aat tct aca aca gtt atc aga gaa gct Tyr Gln Val Lys Tyr Ser Glu Asn Ser Thr Thr Val Ile Arg Glu Ala 290 295 300	912
gac aag att gtc tca gct aca tcc ctg cta gta gac agt ata ctt cct Asp Lys Ile Val Ser Ala Thr Ser Leu Leu Val Asp Ser Ile Leu Pro 305 310 315 320	960
ggg tct tcg tat gag gtt cag gtg agg ggc aag aga ctg gat ggc cca Gly Ser Ser Tyr Glu Val Gln Val Arg Gly Lys Arg Leu Asp Gly Pro 325 330 335	1008
gga atc tgg agt gac tgg agt act cct cgt gtc ttt acc aca caa gat Gly Ile Trp Ser Asp Trp Ser Thr Pro Arg Val Phe Thr Thr Gln Asp 340 345 350	1056
gtc ata tac ttt cca cct aaa att ctg aca agt gtt ggg tct aat gtt Val Ile Tyr Phe Pro Pro Lys Ile Leu Thr Ser Val Gly Ser Asn Val 355 360 365	1104
tct ttt cac tgc atc tat aag aag gaa aac aag att gtt ccc tca aaa Ser Phe His Cys Ile Tyr Lys Lys Glu Asn Lys Ile Val Pro Ser Lys 370 375 380	1152
gag att gtt tgg tgg atg aat tta gct gag aaa att cct caa agc cag Glu Ile Val Trp Trp Met Asn Leu Ala Glu Lys Ile Pro Gln Ser Gln 385 390 395 400	1200

tat gat gtt gtg agt gat cat gtt agc aaa gtt act ttt ttc aat ctg Tyr Asp Val Val Ser Asp His Val Ser Lys Val Thr Phe Phe Asn Leu 405 410 415	1248
aat gaa acc aaa cct cga gga aag ttt acc tat gat gca gtg tac tgc Asn Glu Thr Lys Pro Arg Gly Lys Phe Thr Tyr Asp Ala Val Tyr Cys 420 425 430	1296
tgc aat gaa cat gaa tgc cat cat cgc tat gct gaa tta tat gtg att Cys Asn Glu His Glu Cys His His Arg Tyr Ala Glu Leu Tyr Val Ile 435 440 445	1344
gat gtc aat atc aat atc tca tgt gaa act gat ggg tac tta act aaa Asp Val Asn Ile Asn Ile Ser Cys Glu Thr Asp Gly Tyr Leu Thr Lys 450 455 460	1392
atg act tgc aga tgg tca acc agt aca atc cag tca ctt gcg gaa agc Met Thr Cys Arg Trp Ser Thr Ser Thr Ile Gln Ser Leu Ala Glu Ser 465 470 475 480	1440
act ttg caa ttg agg tat cat agg agc agc ctt tac tgt tct gat att Thr Leu Gln Leu Arg Tyr His Arg Ser Ser Leu Tyr Cys Ser Asp Ile 485 490 495	1488
cca tct att cat ccc ata tct gag ccc aaa gat tgc tat ttg cag agt Pro Ser Ile His Pro Ile Ser Glu Pro Lys Asp Cys Tyr Leu Gln Ser 500 505 510	1536
gat ggt ttt tat gaa tgc att ttc cag cca atc ttc cta tta tct ggc Asp Gly Phe Tyr Glu Cys Ile Phe Gln Pro Ile Phe Leu Leu Ser Gly 515 520 525	1584
tac aca atg tgg att agg atc aat cac tct cta ggt tca ctt gac tct Tyr Thr Met Trp Ile Arg Ile Asn His Ser Leu Gly Ser Leu Asp Ser 530 535 540	1632
cca cca aca tgt gtc ctt cct gat tct gtg gtg aag cca ctg cct cca Pro Pro Thr Cys Val Leu Pro Asp Ser Val Val Lys Pro Leu Pro Pro 545 550 555 560	1680
tcc agt gtg aaa gca gaa att act ata aac att gga tta ttg aaa ata Ser Ser Val Lys Ala Glu Ile Thr Ile Asn Ile Gly Leu Leu Lys Ile 565 570 575	1728
tct tgg gaa aag cca gtc ttt cca gag aat aac cttcaa ttc cag att Ser Trp Glu Lys Pro Val Phe Pro Glu Asn Asn Leu Gln Phe Gln Ile 580 585 590	1776
cgc tat ggt tta agt gga aaa gaa gta caa tgg aag atg tat gag gtt Arg Tyr Gly Leu Ser Gly Lys Glu Val Gln Trp Lys Met Tyr Glu Val 595 600 605	1824
tat gat gca aaa tca aaa tct gtc agt ctc cca gtt cca gac ttg tgt Tyr Asp Ala Lys Ser Lys Ser Val Ser Leu Pro Val Pro Asp Leu Cys 610 615 620	1872
gca gtc tat gct gtt cag gtg cgc tgt aag agg cta gat gga ctg gga Ala Val Tyr Ala Val Gln Val Arg Cys Lys Arg Leu Asp Gly Leu Gly 625 630 635 640	1920
tat tgg agt aat tgg agc aat cca gcc tac aca gtt gtc atg gat ata	1968

Tyr Trp Ser Asn Trp Ser Asn Pro Ala Tyr Thr Val Val Met Asp Ile			
645	650	655	
aaa gtt cct atg aga gga cct gaa ttt tgg aga ata att aat gga gat			2016
Lys Val Pro Met Arg Gly Pro Glu Phe Trp Arg Ile Ile Asn Gly Asp			
660	665	670	
act atg aaa aag gag aaa aat gtc act tta ctt tgg aag ccc ctg atg			2064
Thr Met Lys Lys Glu Lys Asn Val Thr Leu Leu Trp Lys Pro Leu Met			
675	680	685	
aaa aat gac tca ttg tgc agt gtt cag aga tat gtg ata aac cat cat			2112
Lys Asn Asp Ser Leu Cys Ser Val Gln Arg Tyr Val Ile Asn His His			
690	695	700	
act tcc tgc aat gga aca tgg tca gaa gat gtg gga aat cac acg aaa			2160
Thr Ser Cys Asn Gly Thr Trp Ser Glu Asp Val Gly Asn His Thr Lys			
705	710	715	720
ttc act ttc ctg tgg aca gag caa gca cat act gtt acg gtt ctg gcc			2208
Phe Thr Phe Leu Trp Thr Glu Gln Ala His Thr Val Thr Val Leu Ala			
725	730	735	
atc aat tca att ggt gct tct gtt gca aat ttt aat tta acc ttt tca			2256
Ile Asn Ser Ile Gly Ala Ser Val Ala Asn Phe Asn Leu Thr Phe Ser			
740	745	750	
tgg cct atg agc aaa gta aat atc gtg cag tca ctc agt gct tat cct			2304
Trp Pro Met Ser Lys Val Asn Ile Val Gln Ser Leu Ser Ala Tyr Pro			
755	760	765	
tta aac agc agt tgt gtg att gtt tcc tgg ata cta tca ccc agt gat			2352
Leu Asn Ser Ser Cys Val Ile Val Ser Trp Ile Leu Ser Pro Ser Asp			
770	775	780	
tac aag cta atg tat ttt att att gag tgg aaa aat ctt aat gaa gat			2400
Tyr Lys Leu Met Tyr Phe Ile Ile Glu Trp Lys Asn Leu Asn Glu Asp			
785	790	795	800
ggt gaa ata aaa tgg ctt aga atc tct tca tct gtt aag aag tat tat			2448
Gly Glu Ile Lys Trp Leu Arg Ile Ser Ser Val Lys Lys Tyr Tyr			
805	810	815	
atc cat gat cat ttt atc ccc att gag aag tac cag ttc agt ctt tac			2496
Ile His Asp His Phe Ile Pro Ile Glu Lys Tyr Gln Phe Ser Leu Tyr			
820	825	830	
cca ata ttt atg gaa gga gtg gga aaa cca aag ata att aat agt ttc			2544
Pro Ile Phe Met Glu Gly Val Gly Lys Pro Lys Ile Ile Asn Ser Phe			
835	840	845	
act caa gat gat att gaa aaa cac cag agt gat gca ggt tta tat gta			2592
Thr Gln Asp Asp Ile Glu Lys His Gln Ser Asp Ala Gly Leu Tyr Val			
850	855	860	
att gtg cca gta att att tcc tct tcc atc tta ttg ctt gga aca tta			2640
Ile Val Pro Val Ile Ile Ser Ser Ile Leu Leu Gly Thr Leu			
865	870	875	880
tta ata tca cac caa aga atg aaa aag cta ttt tgg gaa gat gtt ccg			2688
Leu Ile Ser His Gln Arg Met Lys Lys Leu Phe Trp Glu Asp Val Pro			

885

890

895

aac ccc aag aat tgt tcc tgg gca caa gga ctt aat ttt cag aag aga Asn Pro Lys Asn Cys Ser Trp Ala Gln Gly Leu Asn Phe Gln Lys Arg 900	905	910	2736
acg gac att ctg gat cca ccg gct aga gcc acc atg acc acc agc aag gtg Thr Asp Ile Leu Asp Pro Pro Ala Arg Ala Thr Met Thr Ser Lys Val 915	920	925	2784
tac gac ccc gag cag agg aag agg atg atc acc ggc ccc cag tgg tgg Tyr Asp Pro Glu Gln Arg Lys Arg Met Ile Thr Gly Pro Gln Trp Trp 930	935	940	2832
gcc agg tgc aag cag atg aac gtg ctg gac agc ttc atc aac tac tac Ala Arg Cys Lys Gln Met Asn Val Leu Asp Ser Phe Ile Asn Tyr Tyr 945	950	955	2880
gac agc gag aag cac gcc gag aac gcc gtg atc ttc ctg cac ggc aac Asp Ser Glu Lys His Ala Glu Asn Ala Val Ile Phe Leu His Gly Asn 965	970	975	2928
gcc gct agc agc tac ctg tgg agg cac gtg gtg ccc cac atc gag ccc Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Trp Arg His Val Val Pro His Ile Glu Pro 980	985	990	2976
gtg gcc agg tgc atc atc ccc gat ctg atc ggc atg ggc aag agc ggc Val Ala Arg Cys Ile Ile Pro Asp Leu Ile Gly Met Gly Lys Ser Gly 995	1000	1005	3024
aag agc ggc aac ggc agc tac agg ctg ctg gac cac tac aag tac ctg Lys Ser Gly Asn Gly Ser Tyr Arg Leu Leu Asp His Tyr Lys Tyr Leu 1010	1015	1020	3072
acc gcc tgg ttc gag ctc ctg aac ctg ccc aag aag atc atc ttc gtg Thr Ala Trp Phe Glu Leu Leu Asn Leu Pro Lys Lys Ile Ile Phe Val 1025	1030	1035	3120
ggc cac gac tgg ggc gcc tgc ctg gcc ttc cac tac agc tac gag cac Gly His Asp Trp Gly Ala Cys Leu Ala Phe His Tyr Ser Tyr Glu His 1045	1050	1055	3168
cag gag aag atc aag gcc atc gtg cac gcc gag agc gtg gtg gac gtg Gln Asp Lys Ile Lys Ala Ile Val His Ala Glu Ser Val Val Asp Val 1060	1065	1070	3216
atc gag agc tgg gac gag tgg cca gac atc gag gag gac atc gcc ctg Ile Glu Ser Trp Asp Glu Trp Pro Asp Ile Glu Glu Asp Ile Ala Leu 1075	1080	1085	3264
atc aag agc gag gag ggc gag aag atg gtg ctg gag aac aac ttc ttc Ile Lys Ser Glu Glu Gly Glu Lys Met Val Leu Glu Asn Asn Phe Phe 1090	1095	1100	3312
gtg gag acc atg ctg ccc agc aag atc atg aga aag ctg gag ccc gag Val Glu Thr Met Leu Pro Ser Lys Ile Met Arg Lys Leu Glu Pro Glu 1105	1110	1115	3360
gag ttc gcc gcc tac ctg gag ccc ttc aag gag aag ggc gag gtg aga Glu Phe Ala Ala Tyr Leu Glu Pro Phe Lys Glu Lys Gly Glu Val Arg 1125	1130	1135	3408

aga ccc acc ctg agc tgg ccc aga gag atc ccc ctg gtg aag ggc ggc	3456		
Arg Pro Thr Leu Ser Trp Pro Arg Glu Ile Pro Leu Val Lys Gly Gly			
1140	1145	1150	
aag ccc gac gtg gtg cag atc gtg aga aac tac aac gcc tac ctg aga	3504		
Lys Pro Asp Val Val Gln Ile Val Arg Asn Tyr Asn Ala Tyr Leu Arg			
1155	1160	1165	
gcc agc gac gac ctg ccc aag atg ttc atc gag agc gac ccc ggc ttc	3552		
Ala Ser Asp Asp Leu Pro Lys Met Phe Ile Glu Ser Asp Pro Gly Phe			
1170	1175	1180	
ttc agc aac gcc atc gtg gag ggc gcc aag aag ttc ccc aac acc gag	3600		
Phe Ser Asn Ala Ile Val Glu Gly Ala Lys Lys Phe Pro Asn Thr Glu			
1185	1190	1195	1200
ttc gtg aag gtg aag ggc ctg cac ttc agc cag gag gac gcc ccc gac	3648		
Phe Val Lys Val Lys Gly Leu His Phe Ser Gln Glu Asp Ala Pro Asp			
1205	1210	1215	
gag atg ggc aag tac atc aag agc ttc gtg gag aga gtg ctg aag aac	3696		
Glu Met Gly Lys Tyr Ile Lys Ser Phe Val Glu Arg Val Leu Lys Asn			
1220	1225	1230	
gag cag taa	3705		
Glu Gln			
1235			

Thr Thr Phe Val Ser Thr Val Asn Ser Leu Val Phe Gln Gln Ile Asp
130 135 140

Ala Asn Trp Asn Ile Gln Cys Trp Leu Lys Gly Asp Leu Lys Leu Phe
145 150 155 160

Ile Cys Tyr Val Glu Ser Leu Phe Lys Asn Leu Phe Arg Asn Tyr Asn
165 170 175

Tyr Lys Val His Leu Leu Tyr Val Leu Pro Glu Val Leu Glu Asp Ser
180 185 190

Pro Leu Val Pro Gln Lys Gly Ser Phe Gln Met Val His Cys Asn Cys
195 200 205

Ser Val His Glu Cys Cys Glu Cys Leu Val Pro Val Pro Thr Ala Lys
210 215 220

Leu Asn Asp Thr Leu Leu Met Cys Leu Lys Ile Thr Ser Gly Gly Val
225 230 235 240

Ile Phe Arg Ser Pro Leu Met Ser Val Gln Pro Ile Asn Met Val Lys
245 250 255

Pro Asp Pro Pro Leu Gly Leu His Met Glu Ile Thr Asp Asp Gly Asn
260 265 270

Leu Lys Ile Ser Trp Ser Ser Pro Pro Leu Val Pro Phe Pro Leu Gln
275 280 285

Tyr Gln Val Lys Tyr Ser Glu Asn Ser Thr Thr Val Ile Arg Glu Ala
290 295 300

Asp Lys Ile Val Ser Ala Thr Ser Leu Leu Val Asp Ser Ile Leu Pro
305 310 315 320

Gly Ser Ser Tyr Glu Val Gln Val Arg Gly Lys Arg Leu Asp Gly Pro
325 330 335

Gly Ile Trp Ser Asp Trp Ser Thr Pro Arg Val Phe Thr Thr Gln Asp
340 345 350

Val Ile Tyr Phe Pro Pro Lys Ile Leu Thr Ser Val Gly Ser Asn Val
355 360 365

Ser Phe His Cys Ile Tyr Lys Lys Glu Asn Lys Ile Val Pro Ser Lys
370 375 380

Glu Ile Val Trp Trp Met Asn Leu Ala Glu Lys Ile Pro Gln Ser Gln
385 390 395 400

Tyr Asp Val Val Ser Asp His Val Ser Lys Val Thr Phe Phe Asn Leu
405 410 415

Asn Glu Thr Lys Pro Arg Gly Lys Phe Thr Tyr Asp Ala Val Tyr Cys
420 425 430

Cys Asn Glu His Glu Cys His His Arg Tyr Ala Glu Leu Tyr Val Ile
435 440 445

Asp Val Asn Ile Asn Ile Ser Cys Glu Thr Asp Gly Tyr Leu Thr Lys
450 455 460

Met Thr Cys Arg Trp Ser Thr Ser Thr Ile Gln Ser Leu Ala Glu Ser
465 470 475 480

Thr Leu Gln Leu Arg Tyr His Arg Ser Ser Leu Tyr Cys Ser Asp Ile
485 490 495

Pro Ser Ile His Pro Ile Ser Glu Pro Lys Asp Cys Tyr Leu Gln Ser
500 505 510

Asp Gly Phe Tyr Glu Cys Ile Phe Gln Pro Ile Phe Leu Leu Ser Gly
515 520 525

Tyr Thr Met Trp Ile Arg Ile Asn His Ser Leu Gly Ser Leu Asp Ser
530 535 540

Pro Pro Thr Cys Val Leu Pro Asp Ser Val Val Lys Pro Leu Pro Pro
545 550 555 560

Ser Ser Val Lys Ala Glu Ile Thr Ile Asn Ile Gly Leu Leu Lys Ile
565 570 575

Ser Trp Glu Lys Pro Val Phe Pro Glu Asn Asn Leu Gln Phe Gln Ile
580 585 590

Arg Tyr Gly Leu Ser Gly Lys Glu Val Gln Trp Lys Met Tyr Glu Val
595 600 605

Tyr Asp Ala Lys Ser Lys Ser Val Ser Leu Pro Val Pro Asp Leu Cys
610 615 620

Ala Val Tyr Ala Val Gln Val Arg Cys Lys Arg Leu Asp Gly Leu Gly
625 630 635 640

Tyr Trp Ser Asn Trp Ser Asn Pro Ala Tyr Thr Val Val Met Asp Ile
645 650 655

Lys Val Pro Met Arg Gly Pro Glu Phe Trp Arg Ile Ile Asn Gly Asp
660 665 670

Thr Met Lys Lys Glu Lys Asn Val Thr Leu Leu Trp Lys Pro Leu Met
675 680 685

Lys Asn Asp Ser Leu Cys Ser Val Gln Arg Tyr Val Ile Asn His His
690 695 700

Thr Ser Cys Asn Gly Thr Trp Ser Glu Asp Val Gly Asn His Thr Lys
705 710 715 720

Phe Thr Phe Leu Trp Thr Glu Gln Ala His Thr Val Thr Val Leu Ala
725 730 735

Ile Asn Ser Ile Gly Ala Ser Val Ala Asn Phe Asn Leu Thr Phe Ser
740 745 750

Trp Pro Met Ser Lys Val Asn Ile Val Gln Ser Leu Ser Ala Tyr Pro
755 760 765

Leu Asn Ser Ser Cys Val Ile Val Ser Trp Ile Leu Ser Pro Ser Asp

23/33

770 775 780

Tyr Lys Leu Met Tyr Phe Ile Ile Glu Trp Lys Asn Leu Asn Glu Asp
785 790 795 800Gly Glu Ile Lys Trp Leu Arg Ile Ser Ser Ser Val Lys Lys Tyr Tyr
805 810 815Ile His Asp His Phe Ile Pro Ile Glu Lys Tyr Gln Phe Ser Leu Tyr
820 825 830Pro Ile Phe Met Glu Gly Val Gly Lys Pro Lys Ile Ile Asn Ser Phe
835 840 845Thr Gln Asp Asp Ile Glu Lys His Gln Ser Asp Ala Gly Leu Tyr Val
850 855 860Ile Val Pro Val Ile Ile Ser Ser Ser Ile Leu Leu Leu Gly Thr Leu
865 870 875 880Leu Ile Ser His Gln Arg Met Lys Lys Leu Phe Trp Glu Asp Val Pro
885 890 895Asn Pro Lys Asn Cys Ser Trp Ala Gln Gly Leu Asn Phe Gln Lys Arg
900 905 910Thr Asp Ile Leu Asp Pro Pro Ala Arg Ala Thr Met Thr Ser Lys Val
915 920 925Tyr Asp Pro Glu Gln Arg Lys Arg Met Ile Thr Gly Pro Gln Trp Trp
930 935 940Ala Arg Cys Lys Gln Met Asn Val Leu Asp Ser Phe Ile Asn Tyr Tyr
945 950 955 960Asp Ser Glu Lys His Ala Glu Asn Ala Val Ile Phe Leu His Gly Asn
965 970 975Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Trp Arg His Val Val Pro His Ile Glu Pro
980 985 990Val Ala Arg Cys Ile Ile Pro Asp Leu Ile Gly Met Gly Lys Ser Gly
995 1000 1005Lys Ser Gly Asn Gly Ser Tyr Arg Leu Leu Asp His Tyr Lys Tyr Leu
1010 1015 1020Thr Ala Trp Phe Glu Leu Leu Asn Leu Pro Lys Lys Ile Ile Phe Val
1025 1030 1035 1040Gly His Asp Trp Gly Ala Cys Leu Ala Phe His Tyr Ser Tyr Glu His
1045 1050 1055Gln Asp Lys Ile Lys Ala Ile Val His Ala Glu Ser Val Val Asp Val
1060 1065 1070Ile Glu Ser Trp Asp Glu Trp Pro Asp Ile Glu Glu Asp Ile Ala Leu
1075 1080 1085Ile Lys Ser Glu Glu Gly Glu Lys Met Val Leu Glu Asn Asn Phe Phe
1090 1095 1100

Val Glu Thr Met Leu Pro Ser Lys Ile Met Arg Lys Leu Glu Pro Glu
 105 1110 1115 1120

Glu Phe Ala Ala Tyr Leu Glu Pro Phe Lys Glu Lys Gly Glu Val Arg
 1125 1130 1135

Arg Pro Thr Leu Ser Trp Pro Arg Glu Ile Pro Leu Val Lys Gly Gly
 1140 1145 1150

Lys Pro Asp Val Val Gln Ile Val Arg Asn Tyr Asn Ala Tyr Leu Arg
 1155 1160 1165

Ala Ser Asp Asp Leu Pro Lys Met Phe Ile Glu Ser Asp Pro Gly Phe
 1170 1175 1180

Phe Ser Asn Ala Ile Val Glu Gly Ala Lys Lys Phe Pro Asn Thr Glu
 185 1190 1195 1200

Phe Val Lys Val Lys Gly Leu His Phe Ser Gln Glu Asp Ala Pro Asp
 1205 1210 1215

Glu Met Gly Lys Tyr Ile Lys Ser Phe Val Glu Arg Val Leu Lys Asn
 1220 1225 1230

Glu Gln

<210> 7

<211> 3486

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence
artificielle:fusionOBRyfp

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(3486)

<400> 7

atg gtt ctt gcc agc tct acc acc agc atc cac acc atg ctg ctc ctg 48
 Met Val Ala Ser Ser Thr Thr Ser Ile His Thr Met Leu Leu Leu
 1 5 10 15

ctc ctg atg ctc ttc cac ctg gga ctc caa gct tca atc tcg gcg cgc 96
 Leu Leu Met Leu Phe His Leu Gly Leu Gln Ala Ser Ile Ser Ala Arg
 20 25 30

cag gag cag aag ctt atc tcg gag gag gac ctg acg cgt tat cca att 144
 Gln Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Thr Arg Tyr Pro Ile
 35 40 45

act cct tgg aga ttt aag ttg tct tgc atg cca cca aat tca acc tat 192
 Thr Pro Trp Arg Phe Lys Leu Ser Cys Met Pro Pro Asn Ser Thr Tyr
 50 55 60

gac tac ttc ctt ttg cct gct gga ctc tca aag aat act tca aat tcg 240
 Asp Tyr Phe Leu Leu Pro Ala Gly Leu Ser Lys Asn Thr Ser Asn Ser

65	70	75	80	
aat gga cat tat gag aca gct gtt gaa cct aag ttt aat tca agt ggt Asn Gly His Tyr Glu Thr Ala Val Glu Pro Lys Phe Asn Ser Ser Gly 85 90 95				288
act cac ttt tct aac tta tcc aaa aca act ttc cac tgt tgc ttt cggt Thr His Phe Ser Asn Leu Ser Lys Thr Thr Phe His Cys Cys Phe Arg 100 105 110				336
agt gag caa gat aga aac tgc tcc tta tgt gca gac aac att gaa gga Ser Glu Gln Asp Arg Asn Cys Ser Leu Cys Ala Asp Asn Ile Glu Gly 115 120 125				384
acg aca ttt gtt tca aca gta aat tct tta gtt ttt caa caa ata gat Thr Thr Phe Val Ser Thr Val Asn Ser Leu Val Phe Gln Gln Ile Asp 130 135 140				432
gca aac tgg aac ata cag tgc tgg cta aaa gga gac tta aaa tta ttc Ala Asn Trp Asn Ile Gln Cys Trp Leu Lys Gly Asp Leu Lys Leu Phe 145 150 155 160				480
atc tgt tat gtg gag tca tta ttt aag aat cta ttc agg aat tat aac Ile Cys Tyr Val Glu Ser Leu Phe Lys Asn Leu Phe Arg Asn Tyr Asn 165 170 175				528
tat aag gtc cat ctt tta tat gtt ctg cct gaa gtg tta gaa gat tca Tyr Lys Val His Leu Leu Tyr Val Leu Pro Glu Val Leu Glu Asp Ser 180 185 190				576
cct ctg gtt ccc caa aaa ggc agt ttt cag atg gtt cac tgc aat tgc Pro Leu Val Pro Gln Lys Gly Ser Phe Gln Met Val His Cys Asn Cys 195 200 205				624
agt gtt cat gaa tgt tgt gaa tgt ctt gtg cct gtg cca aca gcc aaa Ser Val His Glu Cys Cys Glu Cys Leu Val Pro Val Pro Thr Ala Lys 210 215 220				672
ctc aac gac act ctc ctt atg tgt ttg aaa atc aca tct ggt gga gta Leu Asn Asp Thr Leu Leu Met Cys Leu Lys Ile Thr Ser Gly Gly Val 225 230 235 240				720
att ttc cgg tca cct cta atg tca gtt cag ccc ata aat atg gtg aag Ile Phe Arg Ser Pro Leu Met Ser Val Gln Pro Ile Asn Met Val Lys 245 250 255				768
cct gat cca cca tta ggt ttg cat atg gaa atc aca gat gat ggt aat Pro Asp Pro Pro Leu Gly Leu His Met Glu Ile Thr Asp Asp Gly Asn 260 265 270				816
tta aag att tct tgg tcc agc cca cca ttg gta cca ttt cca ctt caa Leu Lys Ile Ser Trp Ser Ser Pro Pro Leu Val Pro Phe Pro Leu Gln 275 280 285				864
tat caa gtg aaa tat tca gag aat tct aca aca gtt atc aga gaa gct Tyr Gln Val Lys Tyr Ser Glu Asn Ser Thr Thr Val Ile Arg Glu Ala 290 295 300				912
gac aag att gtc tca gct aca tcc ctg cta gta gac agt ata ctt cct Asp Lys Ile Val Ser Ala Thr Ser Leu Leu Val Asp Ser Ile Leu Pro 305 310 315 320				960

ggg tct tcg tat gag gtt cag gtg agg ggc aag aga ctg gat ggc cca Gly Ser Ser Tyr Glu Val Gln Val Arg Gly Lys Arg Leu Asp Gly Pro 325 330 335	1008
gga atc tgg agt gac tgg agt act cct cgt gtc ttt acc aca caa gat Gly Ile Trp Ser Asp Trp Ser Thr Pro Arg Val Phe Thr Thr Gln Asp 340 345 350	1056
gtc ata tac ttt cca cct aaa att ctg aca agt gtt ggg tct aat gtt Val Ile Tyr Phe Pro Pro Lys Ile Leu Thr Ser Val Gly Ser Asn Val 355 360 365	1104
tct ttt cac tgc atc tat aag aag gaa aac aag att gtt ccc tca aaa Ser Phe His Cys Ile Tyr Lys Lys Glu Asn Lys Ile Val Pro Ser Lys 370 375 380	1152
gag att gtt tgg tgg atg aat tta gct gag aaa att cct caa agc cag Glu Ile Val Trp Trp Met Asn Leu Ala Glu Lys Ile Pro Gln Ser Gln 385 390 395 400	1200
tat gat gtt gtg agt gat cat gtt agc aaa gtt act ttt ttc aat ctg Tyr Asp Val Val Ser Asp His Val Ser Lys Val Thr Phe Phe Asn Leu 405 410 415	1248
aat gaa acc aaa cct cga gga aag ttt acc tat gat gca gtg tac tgc Asn Glu Thr Lys Pro Arg Gly Lys Phe Thr Tyr Asp Ala Val Tyr Cys 420 425 430	1296
tgc aat gaa cat gaa tgc cat cat cgc tat gct gaa tta tat gtg att Cys Asn Glu His Glu Cys His His Arg Tyr Ala Glu Leu Tyr Val Ile 435 440 445	1344
gat gtc aat atc aat atc tca tgt gaa act gat ggg tac tta act aaa Asp Val Asn Ile Asn Ile Ser Cys Glu Thr Asp Gly Tyr Leu Thr Lys 450 455 460	1392
atg act tgc aga tgg tca acc agt aca atc cag tca ctt gcg gaa agc Met Thr Cys Arg Trp Ser Thr Ser Thr Ile Gln Ser Leu Ala Glu Ser 465 470 475 480	1440
act ttg caa ttg agg tat cat agg agc agc ctt tac tgt tct gat att Thr Leu Gln Leu Arg Tyr His Arg Ser Ser Leu Tyr Cys Ser Asp Ile 485 490 495	1488
cca tct att cat ccc ata tct gag ccc aaa gat tgc tat ttg cag agt Pro Ser Ile His Pro Ile Ser Glu Pro Lys Asp Cys Tyr Leu Gln Ser 500 505 510	1536
gat ggt ttt tat gaa tgc att ttc cag cca atc ttc cta tta tct ggc Asp Gly Phe Tyr Glu Cys Ile Phe Gln Pro Ile Phe Leu Leu Ser Gly 515 520 525	1584
tac aca atg tgg att agg atc aat cac tct cta ggt tca ctt gac tct Tyr Thr Met Trp Ile Arg Ile Asn His Ser Leu Gly Ser Leu Asp Ser 530 535 540	1632
cca cca aca tgt gtc ctt cct gat tct gtg gtg aag cca ctg cct cca Pro Pro Thr Cys Val Leu Pro Asp Ser Val Val Lys Pro Leu Pro Pro 545 550 555 560	1680

tcc agt gtg aaa gca gaa att act ata aac att gga tta ttg aaa ata Ser Ser Val Lys Ala Glu Ile Thr Ile Asn Ile Gly Leu Leu Lys Ile	1728
565 570 575	
tct tgg gaa aag cca gtc ttt cca gag aat aac ctt caa ttc cag att Ser Trp Glu Lys Pro Val Phe Pro Glu Asn Asn Leu Gln Phe Gln Ile	1776
580 585 590	
cgc tat ggt tta agt gga aaa gaa gta caa tgg aag atg tat gag gtt Arg Tyr Gly Leu Ser Gly Lys Glu Val Gln Trp Lys Met Tyr Glu Val	1824
595 600 605	
tat gat gca aaa tca aaa tct gtc agt ctc cca gtt cca gac ttg tgt Tyr Asp Ala Lys Ser Lys Ser Val Ser Leu Pro Val Pro Asp Leu Cys	1872
610 615 620	
gca gtc tat gct gtt cag gtg cgc tgt aag agg cta gat gga ctg gga Ala Val Tyr Ala Val Gln Val Arg Cys Lys Arg Leu Asp Gly Leu Gly	1920
625 630 635 640	
tat tgg agt aat tgg agc aat cca gcc tac aca gtt gtc atg gat ata Tyr Trp Ser Asn Trp Ser Asn Pro Ala Tyr Thr Val Val Met Asp Ile	1968
645 650 655	
aaa gtt cct atg aga gga cct gaa ttt tgg aga ata att aat gga gat Lys Val Pro Met Arg Gly Pro Glu Phe Trp Arg Ile Ile Asn Gly Asp	2016
660 665 670	
act atg aaa aag gag aaa aat gtc act tta ctt tgg aag ccc ctg atg Thr Met Lys Lys Glu Lys Asn Val Thr Leu Leu Trp Lys Pro Leu Met	2064
675 680 685	
aaa aat gac tca ttg tgc agt gtt cag aga tat gtg ata aac cat cat Lys Asn Asp Ser Leu Cys Ser Val Gln Arg Tyr Val Ile Asn His His	2112
690 695 700	
act tcc tgc aat gga aca tgg tca gaa gat gtg gga aat cac acg aaa Thr Ser Cys Asn Gly Thr Trp Ser Glu Asp Val Gly Asn His Thr Lys	2160
705 710 715 720	
ttc act ttc ctg tgg aca gag caa gca cat act gtt acg gtt ctg gcc Phe Thr Phe Leu Trp Thr Glu Gln Ala His Thr Val Thr Val Leu Ala	2208
725 730 735	
atc aat tca att ggt gct tct gtt gca aat ttt aat tta acc ttt tca Ile Asn Ser Ile Gly Ala Ser Val Ala Asn Phe Asn Leu Thr Phe Ser	2256
740 745 750	
tgg cct atg agc aaa gta aat atc gtg cag tca ctc agt gct tat cct Trp Pro Met Ser Lys Val Asn Ile Val Gln Ser Leu Ser Ala Tyr Pro	2304
755 760 765	
tta aac agc agt tgt gtg att gtt tcc tgg ata cta tca ccc agt gat Leu Asn Ser Ser Cys Val Ile Val Ser Trp Ile Leu Ser Pro Ser Asp	2352
770 775 780	
tac aag cta atg tat ttt att att gag tgg aaa aat ctt aat gaa gat Tyr Lys Leu Met Tyr Phe Ile Ile Glu Trp Lys Asn Leu Asn Glu Asp	2400
785 790 795 800	
ggg gaa ata aaa tgg ctt aga atc tct tca tct gtt aag aag tat tat	2448

Gly Glu Ile Lys Trp Leu Arg Ile Ser Ser Ser Val Lys Lys Tyr Tyr			
805	810	815	
atc cat gat cat ttt atc ccc att gag aag tac cag ttc agt ctt tac			2496
Ile His Asp His Phe Ile Pro Ile Glu Lys Tyr Gln Phe Ser Leu Tyr			
820	825	830	
cca ata ttt atg gaa gga gtg gga aaa cca aag ata att aat agt ttc			2544
Pro Ile Phe Met Glu Gly Val Gly Lys Pro Lys Ile Ile Asn Ser Phe			
835	840	845	
act caa gat gat att gaa aaa cac cag agt gat gca ggt tta tat gta			2592
Thr Gln Asp Asp Ile Glu Lys His Gln Ser Asp Ala Gly Leu Tyr Val			
850	855	860	
att gtg cca gta att att tcc tct tcc atc tta ttg ctt gga aca tta			2640
Ile Val Pro Val Ile Ile Ser Ser Ile Leu Leu Leu Gly Thr Leu			
865	870	875	880
tta ata tca caccaa aga atg aaa aag cta ttt tgg gaa gat gtt ccg			2688
Leu Ile Ser His Gln Arg Met Lys Lys Leu Phe Trp Glu Asp Val Pro			
885	890	895	
aac ccc aag aat tgt tcc tgg gca caa gga ctt aat ttt cag aag aga			2736
Asn Pro Lys Asn Cys Ser Trp Ala Gln Gly Leu Asn Phe Gln Lys Arg			
900	905	910	
acg gac att ctg gat cca ccg gtc gcc acc atg gtg agc aag ggc gag			2784
Thr Asp Ile Leu Asp Pro Pro Val Ala Thr Met Val Ser Lys Gly Glu			
915	920	925	
gag ctg ttc acc ggg gtg gtg ccc atc ctg gtc gag ctg gac ggc gac			2832
Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu Val Glu Leu Asp Gly Asp			
930	935	940	
gta aac ggc cac aag ttc agc gtg tcc ggc gag ggc gag ggc gat gcc			2880
Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly Glu Gly Glu Gly Asp Ala			
945	950	955	960
acc tac ggc aag ctg acc ctg aag ttc atc tgc acc acc ggc aag ctg			2928
Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile Cys Thr Thr Gly Lys Leu			
965	970	975	
ccc gtg ccc tgg ccc acc ctc gtg acc acc ttc ggc tac ggc gtg cag			2976
Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr Phe Gly Tyr Gly Val Gln			
980	985	990	
tgc ttc gcc cgc tac ccc gac cac atg cgc cag cac gac ttc ttc aag			3024
Cys Phe Ala Arg Tyr Pro Asp His Met Arg Gln His Asp Phe Phe Lys			
995	1000	1005	
tcc gcc atg ccc gaa ggc tac gtc cag gag cgc acc atc ttc ttc aag			3072
Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu Arg Thr Ile Phe Phe Lys			
1010	1015	1020	
gac gac ggc aac tac aag acc cgc gcc gag gtg aag ttc gag ggc gac			3120
Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu Val Lys Phe Glu Gly Asp			
1025	1030	1035	1040
acc ctg gtg aac cgc atc gag ctg aag ggc atc gac ttc aag gag gac			3168
Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly Ile Asp Phe Lys Glu Asp			

29/33

1045

1050

1055

ggc aac atc ctg ggg cac aag ctg gag tac aac tac aac agc cac aac 3216
 Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr Asn Tyr Asn Ser His Asn
 1060 1065 1070

gtc tat atc atg gcc gac aag cag aag aac ggc atc aag gtg aac ttc 3264
 Val Tyr Ile Met Ala Asp Lys Gln Lys Asn Gly Ile Lys Val Asn Phe
 1075 1080 1085

aag atc cgc cac aac atc gag gac ggc agc gtg cag ctc gcc gac cac 3312
 Lys Ile Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Ser Val Gln Leu Ala Asp His
 1090 1095 1100

tac cag cag aac acc ccc atc ggc gac ggc ccc gtg ctg ctg ccc gac 3360
 Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly Pro Val Leu Leu Pro Asp
 1105 1110 1115 1120

aac cac tac ctg agc tac cag tcc gcc ctg agc aaa gac ccc aac gag 3408
 Asn His Tyr Leu Ser Tyr Gln Ser Ala Leu Ser Lys Asp Pro Asn Glu
 1125 1130 1135

aag cgc gat cac atg gtc ctg ctg gag ttc gtg acc gcc gcc ggg atc 3456
 Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe Val Thr Ala Ala Gly Ile
 1140 1145 1150

act ctc ggc atg gac gag ctg tac aag taa 3486
 Thr Leu Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys
 1155 1160

<210> 8
 <211> 1161
 <212> PRT
 <213> Séquence artificielle
 <223> Description de la séquence
 artificielle:fusionOBRyfp

<400> 8
 Met Val Leu Ala Ser Ser Thr Thr Ser Ile His Thr Met Leu Leu Leu
 1 5 10 15

Leu Leu Met Leu Phe His Leu Gly Leu Gln Ala Ser Ile Ser Ala Arg
 20 25 30

Gln Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Thr Arg Tyr Pro Ile
 35 40 45

Thr Pro Trp Arg Phe Lys Leu Ser Cys Met Pro Pro Asn Ser Thr Tyr
 50 55 60

Asp Tyr Phe Leu Leu Pro Ala Gly Leu Ser Lys Asn Thr Ser Asn Ser
 65 70 75 80

Asn Gly His Tyr Glu Thr Ala Val Glu Pro Lys Phe Asn Ser Ser Gly
 85 90 95

Thr His Phe Ser Asn Leu Ser Lys Thr Thr Phe His Cys Cys Phe Arg
 100 105 110

Ser Glu Gln Asp Arg Asn Cys Ser Leu Cys Ala Asp Asn Ile Glu Gly

115	120	125
Thr Thr Phe Val Ser Thr Val Asn Ser Leu Val Phe Gln Gln Ile Asp		
130	135	140
Ala Asn Trp Asn Ile Gln Cys Trp Leu Lys Gly Asp Leu Lys Leu Phe		
145	150	155
Ile Cys Tyr Val Glu Ser Leu Phe Lys Asn Leu Phe Arg Asn Tyr Asn		
165	170	175
Tyr Lys Val His Leu Leu Tyr Val Leu Pro Glu Val Leu Glu Asp Ser		
180	185	190
Pro Leu Val Pro Gln Lys Gly Ser Phe Gln Met Val His Cys Asn Cys		
195	200	205
Ser Val His Glu Cys Cys Glu Cys Leu Val Pro Val Pro Thr Ala Lys		
210	215	220
Leu Asn Asp Thr Leu Leu Met Cys Leu Lys Ile Thr Ser Gly Gly Val		
225	230	235
Ile Phe Arg Ser Pro Leu Met Ser Val Gln Pro Ile Asn Met Val Lys		
245	250	255
Pro Asp Pro Pro Leu Gly Leu His Met Glu Ile Thr Asp Asp Gly Asn		
260	265	270
Leu Lys Ile Ser Trp Ser Ser Pro Pro Leu Val Pro Phe Pro Leu Gln		
275	280	285
Tyr Gln Val Lys Tyr Ser Glu Asn Ser Thr Thr Val Ile Arg Glu Ala		
290	295	300
Asp Lys Ile Val Ser Ala Thr Ser Leu Leu Val Asp Ser Ile Leu Pro		
305	310	315
Gly Ser Ser Tyr Glu Val Gln Val Arg Gly Lys Arg Leu Asp Gly Pro		
325	330	335
Gly Ile Trp Ser Asp Trp Ser Thr Pro Arg Val Phe Thr Thr Gln Asp		
340	345	350
Val Ile Tyr Phe Pro Pro Lys Ile Leu Thr Ser Val Gly Ser Asn Val		
355	360	365
Ser Phe His Cys Ile Tyr Lys Lys Glu Asn Lys Ile Val Pro Ser Lys		
370	375	380
Glu Ile Val Trp Trp Met Asn Leu Ala Glu Lys Ile Pro Gln Ser Gln		
385	390	395
Tyr Asp Val Val Ser Asp His Val Ser Lys Val Thr Phe Phe Asn Leu		
405	410	415
Asn Glu Thr Lys Pro Arg Gly Lys Phe Thr Tyr Asp Ala Val Tyr Cys		
420	425	430
Cys Asn Glu His Glu Cys His His Arg Tyr Ala Glu Leu Tyr Val Ile		
435	440	445

Asp Val Asn Ile Asn Ile Ser Cys Glu Thr Asp Gly Tyr Leu Thr Lys
450 455 460

Met Thr Cys Arg Trp Ser Thr Ser Thr Ile Gln Ser Leu Ala Glu Ser
465 470 475 480

Thr Leu Gln Leu Arg Tyr His Arg Ser Ser Leu Tyr Cys Ser Asp Ile
485 490 495

Pro Ser Ile His Pro Ile Ser Glu Pro Lys Asp Cys Tyr Leu Gln Ser
500 505 510

Asp Gly Phe Tyr Glu Cys Ile Phe Gln Pro Ile Phe Leu Leu Ser Gly
515 520 525

Tyr Thr Met Trp Ile Arg Ile Asn His Ser Leu Gly Ser Leu Asp Ser
530 535 540

Pro Pro Thr Cys Val Leu Pro Asp Ser Val Val Lys Pro Leu Pro Pro
545 550 555 560

Ser Ser Val Lys Ala Glu Ile Thr Ile Asn Ile Gly Leu Leu Lys Ile
565 570 575

Ser Trp Glu Lys Pro Val Phe Pro Glu Asn Asn Leu Gln Phe Gln Ile
580 585 590

Arg Tyr Gly Leu Ser Gly Lys Glu Val Gln Trp Lys Met Tyr Glu Val
595 600 605

Tyr Asp Ala Lys Ser Lys Ser Val Ser Leu Pro Val Pro Asp Leu Cys
610 615 620

Ala Val Tyr Ala Val Gln Val Arg Cys Lys Arg Leu Asp Gly Leu Gly
625 630 635 640

Tyr Trp Ser Asn Trp Ser Asn Pro Ala Tyr Thr Val Val Met Asp Ile
645 650 655

Lys Val Pro Met Arg Gly Pro Glu Phe Trp Arg Ile Ile Asn Gly Asp
660 665 670

Thr Met Lys Lys Glu Lys Asn Val Thr Leu Leu Trp Lys Pro Leu Met
675 680 685

Lys Asn Asp Ser Leu Cys Ser Val Gln Arg Tyr Val Ile Asn His His
690 695 700

Thr Ser Cys Asn Gly Thr Trp Ser Glu Asp Val Gly Asn His Thr Lys
705 710 715 720

Phe Thr Phe Leu Trp Thr Glu Gln Ala His Thr Val Thr Val Leu Ala
725 730 735

Ile Asn Ser Ile Gly Ala Ser Val Ala Asn Phe Asn Leu Thr Phe Ser
740 745 750

Trp Pro Met Ser Lys Val Asn Ile Val Gln Ser Leu Ser Ala Tyr Pro
755 760 765

Leu Asn Ser Ser Cys Val Ile Val Ser Trp Ile Leu Ser Pro Ser Asp
770 775 780

Tyr Lys Leu Met Tyr Phe Ile Ile Glu Trp Lys Asn Leu Asn Glu Asp
785 790 795 800

Gly Glu Ile Lys Trp Leu Arg Ile Ser Ser Ser Val Lys Lys Tyr Tyr
805 810 815

Ile His Asp His Phe Ile Pro Ile Glu Lys Tyr Gln Phe Ser Leu Tyr
820 825 830

Pro Ile Phe Met Glu Gly Val Gly Lys Pro Lys Ile Ile Asn Ser Phe
835 840 845

Thr Gln Asp Asp Ile Glu Lys His Gln Ser Asp Ala Gly Leu Tyr Val
850 855 860

Ile Val Pro Val Ile Ile Ser Ser Ser Ile Leu Leu Leu Gly Thr Leu
865 870 875 880

Leu Ile Ser His Gln Arg Met Lys Lys Leu Phe Trp Glu Asp Val Pro
885 890 895

Asn Pro Lys Asn Cys Ser Trp Ala Gln Gly Leu Asn Phe Gln Lys Arg
900 905 910

Thr Asp Ile Leu Asp Pro Pro Val Ala Thr Met Val Ser Lys Gly Glu
915 920 925

Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu Val Glu Leu Asp Gly Asp
930 935 940

Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly Glu Gly Glu Gly Asp Ala
945 950 955 960

Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile Cys Thr Thr Gly Lys Leu
965 970 975

Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr Phe Gly Tyr Gly Val Gln
980 985 990

Cys Phe Ala Arg Tyr Pro Asp His Met Arg Gln His Asp Phe Phe Lys
995 1000 1005

Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu Arg Thr Ile Phe Phe Lys
1010 1015 1020

Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu Val Lys Phe Glu Gly Asp
1025 1030 1035 1040

Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly Ile Asp Phe Lys Glu Asp
1045 1050 1055

Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr Asn Tyr Asn Ser His Asn
1060 1065 1070

Val Tyr Ile Met Ala Asp Lys Gln Lys Asn Gly Ile Lys Val Asn Phe
1075 1080 1085

Lys Ile Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Ser Val Gln Leu Ala Asp His

33/33

1090 1095 1100

Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly Pro Val Leu Leu Pro Asp
105 1110 1115 1120Asn His Tyr Leu Ser Tyr Gln Ser Ala Leu Ser Lys Asp Pro Asn Glu
1125 1130 1135Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe Val Thr Ala Ala Gly Ile
1140 1145 1150Thr Leu Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys
1155 1160

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Applicant(s): JOCKERS, et al.
Serial No.: 10/774,721
Filing Date: 2/9/2004
Docket No.: FRAV2003/0005 US NP
PRIOR ART